

Série A, N° 3725

N° d'ordre

4576

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Mme Claudine FOUQUEY

PREMIÈRE THÈSE

Constitution chimique des Ascarosides A, B et C
Chimie des 3, 6 - didésoxy - aldohexoses

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le 6 juin 61 devant la Commission d'examen

MM. WURMSER

Président

LEDERER

JULIA

} *Examineurs*

Série A, N° 3725

N° d'ordre

4576

THÈSES

PRÉSENTÉES

A LA FACULTÉ DES SCIENCES
DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

POUR OBTENIR

LE GRADE DE DOCTEUR ES SCIENCES PHYSIQUES

PAR

Mme Claudine FOUQUEY

PREMIÈRE THÈSE

Constitution chimique des Ascarosides A, B et C
Chimie des 3, 6 - didésoxy - aldohexoses

DEUXIÈME THÈSE

Propositions données par la Faculté

Soutenues le

devant la Commission d'examen

MM. WURMSER

Président

LEDERER

JULIA

} *Examineurs*



FACULTÉ DES SCIENCES DE L'UNIVERSITÉ DE PARIS

PROFESSEURS

Doyen J. PERES

G. JULIA	T Analyse supérieure et Algèbre supérieure	M. LEVY	T Physique théorique des hautes énergies
DE BROGLIE	T Théories physiques	Mme CHAIX	Chimie biologique
PRENANT	T Anatomie et histol. comparées	Mme HUREL-PY	Biol. vég. (P.C.B.)
PERES	T Mécanique des fluides et applications	PLAUX	Chimie (M.P.C.)
BOURCART	T Géogr. physique et Géol. dynamique	BRUN	T Mécanique exper. des Fluides
PLANTEFOL	T Botanique	LEDERER	T Chimie biologique
GRASSE	T Evolution des êtres organisés	Mme DUBREIL	T Mathématiques
PREVOST	T Chimie organique	Mme LELONG	T Mathem. (E.N.S.)
BOULIGAND	T Application de l'analyse à la Géométrie	BELLAIR	T Géologie (S.P.C.N.)
CHAUDRON	T Chimie appliquée	COTTE	T Physique (Orsay)
WYART	T Minéralogie	DUBOIS J.E.	T Chimie organique
TEISSIER	T Zoologie	LAMOTTE	Zoologie (E.N.S.)
MANGENOT	T Biologie végétale	MICHEL André	T Chimie (S.P.C.N.)
P. AUGER	T Physique quantique et relativité	OLMER	T Énergétique Gie
MONNIER	T Physiologie générale	ROUAULT	T Physique générale
PIVETEAU	T Paléontologie	GAUTHIER	T Mécanique appliquée
ROCARD	T Physique (E.N.S.)	BARCHIEWITZ	T Chimie Physique
H. CARTAN	T Mathématiques (E.N.S.)	BROSSEL	T Physique atomique
LAFFITTE	T Chimie Générale	BUSER	Physiologie comparée
FAVARD	T Géométrie supérieure	CAMUS	Physiol. Vég. (3 ^e Cycle)
COULOMB	T Physique du Globe	CASTAING	Physique générale
Mlle COUSIN	T Biologie animale (S.P.C.N.)	CURIEN	Minéralogie et cristallographie
CHRETIEN	T Chimie minérale	MOYSE	T Physiol. Vég. (Orsay)
P. DRACH	T Zoologie	PANNETIER	Chimie (S.P.C.N.)
KASTLER	T Physique (E.N.S.)	POSSOMPES	T Zoologie
EPHRUSSI	T Génétique	PULLMANN	Chimie théorique
WURMSER	T Biologie physicochimique	TEILLAC	Physique nucléaire et radioactivité
RIVIERE	T Géologie (SPCN) Orsay	TONNELAT	Biol. physico-chimique
GAUTHIERET	T Biol. Végétale (PCB)	VILLE	T Econométrie
LUCAS	T Recherches Physiques	WILLEMART	Chimie (P.C.B.)
A. THOMAS	T Biol. cellulaire	DODE	T Chimie (SPCN) Orsay
ARNULF	T Optique appliquée	FREYMANN	T Physique générale
M. MORAND	T Enseignement de Physique	GUINOCHET	T Biol. Vég. (Orsay)
SOLEILLET	T Physique (P.C.B.)	ROLLET	T Chimie (P.C.B.)
FORTIER	T Mécanique expérimentale des fluides	Mlle JOSIEN	T Chimie (P.C.B.)
DANJON	T Astronomie	CHEVALLEY	T Géométrie algébrique et théorie des groupes
PETIT	T Biologie maritime	ARNOULT	T Electronique
QUENEY	T Météorologie et dynamique atmosphérique	CHAPELLE	T Physique (M.P.C.) (Orsay)
GALLIEN	T Embryologie	DELANGE	T Mathématiques (Orsay)
EICHHORN	T Biologie végétale (S.P.C.N.)	DENY	T Mathématiques (MGP)
DE CUGNAC	T Biologie végétale (S.P.C.N.)	GERMAIN	T Mécanique théorique des fluides
Mlle CAUCHOIS	T Chimie Physique	LUCAS G.	T Géologie
THELLIER	T Physique du Globe	ALLARD	Chimie Physique
L'HERITIER	T Génétique	BERTHELOT	Physique Nucléaire et Radioactivité
GRIVET	T Radioélectricité	BRICARD	Météorologie et Physique de l'Atmosphère
PONCIN	T Mécanique générale	Mme ALBE-FESSARD	Psychophysiol.
DUBREIL	T Arithmétique et théorie des nombres	FRIEDEL	Physique des Solides
QUELET	T Chimie organique	M. JULIA	Etude des molécules organiques complexes
CAGNIARD	T Géophysique appliquée	LENDER	Biol. Animale (S.P.C.N.) (Orsay)
CHAMPETIER	T Chimie macromoléc.él.	MAGAT	Physico-chimie des Rayonnements
CUVILLIER	T Micropaléontologie	Mlle QUINTIN	T Electrochimie
JUNG	T Pétrographie	MONOD	T Chimie du métabolisme
TRILLAT	T Microscopie et diffract. électronique	BENOIT	T Physiologie animale
WIEMANN	T Chimie organique et structurale	DE POSSEL	T Analyse numérique
JACQUINOT	T Spectroscopie et physique céleste	CHARLOT	T Chimie analytique
VASSY	T Physique de l'atmosphère	HAISSINSKY	T Radiochimie
DESTOUCHES	T Théories physiques	LEMEE	T Physiologie B.M.P.V.
FRUVOST	T Géologie	GUERIN	T Chimie M.P.C.
AMIEL	T Chimie générale	CHATELET M	Chimie (S.P.C.N.)
HOCART	T Minéralogie	JEAN	Physique Nucléaire et Radioactivité
J.P. MATHIEU	T Physique (Orsay)	MATTLER	Physique (S.P.C.N.)
COUTEAUX	T Biol. animale (PCB)	MICHEL (Louis)	Physique théorique des hautes énergies
MAY	T Zoologie (Orsay)	RUMPF	Chimie (P.C.B.)
CHOQUET	T Théor. des fonctions et Topologie	BERGERARD	Zoologie (Orsay)
FELDMANN	T Biol. végétale marine	BERTIN	Electronique
GUINIER	T Physique des Solides	BOUSSIÈRES	Chimie des Radioéléments
JOST	T Physiologie comparée	Mme COUTURE	Physique (P.C.B.)
FORTET	T Calcul des prob. et physique mathématique	ELLENBERGER	Géologie Structurale et Géologie appliquée
SCHWARTZ	T Calc. diff. et intégr.	FRANC	Biologie animale
CHOUARD	T Physiologie végétale	SCHNELL	Botanique tropicale
MALAVARD	T Aviation	STOLKOWSKI	Physiologie générale
BRELOT	T Calcul différentiel	ACHER	Chimie Biologique (Orsay)
NORMANT	T Synthèse organique	BAUDOUIN	Biologie animale (P.C.B.)
BENARD	T Chimie minérale	BEAUMONT	Biologie animale (S.P.C.N.)
BUVAT	T Botanique (E.N.S.)	BLAMONT	Géophysique Ionosphère
DUGUE	T Statistiques mathém.	BOURREAU	Biologie Végétale S.P.C.N. (Orsay)
SOULAIRAC	T Psychophysiologie	CURIE D.	Physique (M.G.P.)
ULRICH	T Physiologie végétale	DURAND-DELGA	Géologie
MARECHAL	T Optique théorique et appliquée	FREON	Chimie (P.C.B.)
KIRRMANN	T Théories chimiques	HELLER	Physiologie végétale
CHADEFAUD	T Botanique	TORTRAT	Calcul des Probabilités
Mlle LE BRETON	T Physiol. générale	CAILLEUX	Géologie (S.P.C.N.)
SALEM	T Mathématiques générales	MAGNAN	Physique (M.P.C.)
LELONG	T Mathématiques générales	DAUDEL	Mécanique Ondulatoire appliquée à la chimie théorique et à la Physique Nucléaire
DEVILLERS	T Anatomie et Histol. comparées	Mlle FOURCROY	Biologie Végétale (S.P.C.N.)
EHRESMANN	T Topologie algébrique	BARRAUD	Physiologie Cellulaire
FRANÇON	T Physique (S.P.C.N.)	NOIROT	Evolution des êtres organisés
GLANGEAUD	T Géogr. physique et Géologie dynamique	Mme FOURES-BRUHAT	Mécan. Analytique et Mécanique céleste
GODEMENT	T Mathématiques (MGP)	Mlle VEIL	Physiologie Générale
PISOT	T Techniques mathem. de la Physique	LWOFF	T Microbiologie
ROCH E.	T Géologie	SIESTRUNCK	T Mécanique physique et Expérimentale
SCHATZMANN	T Astrophysique	LACOMBE	T Métallurgie (ORSAY)
TERMIER	T Paléontologie stratigraphique	BROCHARD	T Physique P.C.B. (ORSAY)
ZAMANSKY	T Mathématiques générales	CABANNES	T Mécanique générale
LENNUIER	T Physique (M.G.P.)	LESEUR	T Mathématiques M.P.C. (ORSAY)
RIZET	T Génétique	MAZET	T Mécanique générale (ORSAY)
ROUTHIER	T Géologie appliquée		
Mme TONNELAT	T Relativité		
DIXMIER	T Mathématiques (MPC)		
SOUCHAY	T Chimie générale		
AIGRAIN	T Electrotechn. générale		
BRUSSET	T Chimie minérale		

Secrétaire général R. POULAIN

Cette thèse a été effectuée à l'Institut de Biologie physico-chimique, dans le service de Chimie des Substances naturelles dirigé par M. le Professeur E. Lederer. Je suis heureuse de lui exprimer ma respectueuse reconnaissance pour l'intérêt constant avec lequel il a suivi mes recherches, pour les conseils et les encouragements qu'il m'a toujours prodigués et pour toute la sollicitude qu'il m'a témoignée.

Ce travail a été réalisé sous la direction de Mme J. Polonsky, Maître de Recherches au C.N.R.S. Il m'est particulièrement agréable de pouvoir la remercier ici de l'aide qu'elle m'a constamment apportée. C'est à son enseignement d'une grande rigueur scientifique, à ses conseils éclairés et à ses critiques judicieuses que je dois ma formation de chercheur. Qu'elle me permette de lui exprimer mon respectueux attachement et ma profonde gratitude.

J'adresse mes plus vifs remerciements à M. le Professeur E. Fauré-Frémiet, qui nous a suggéré d'entreprendre cette étude et qui nous a fourni les premiers échantillons d'"alcool ascarylique".

Je tiens à remercier M. le Professeur O. Westphal, le Dr O. Lüderitz, M. S. Stirm, Melle A.M. Staub, chef de service à l'Institut Pasteur, et Melle R. Tinelli de l'apport précieux qu'a représenté pour moi le travail que nous avons effectué en collaboration.

Je remercie M. le Professeur R. Wurmser, directeur de l'Institut de Biologie physico-chimique, où ce travail a été effectué, d'avoir bien voulu accepter la présidence de mon jury et je remercie également M. le Professeur M. Julia qui a bien voulu en faire partie.

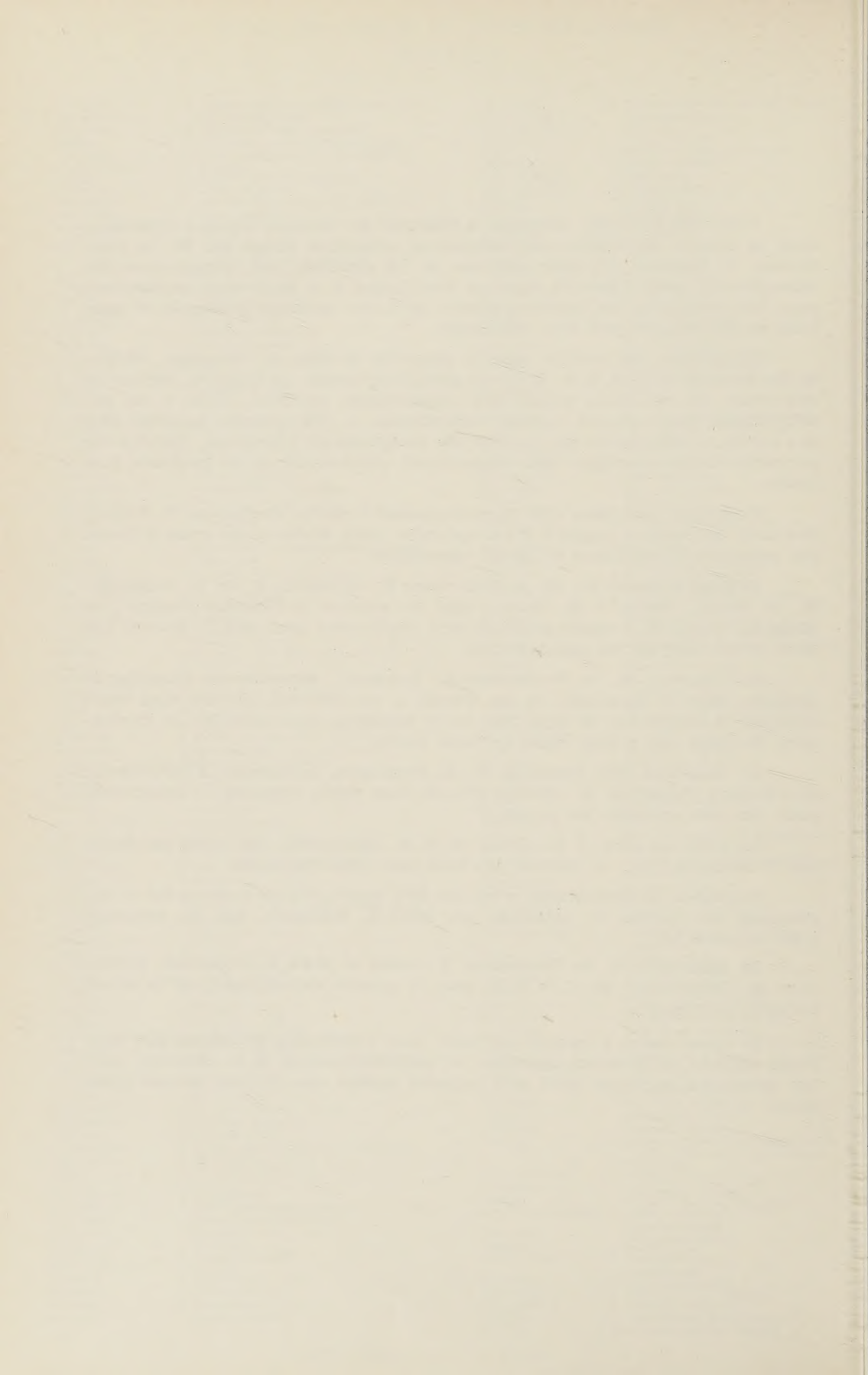
Je remercie très vivement M. E. Stenhagen, professeur à l'Université de Göteborg (Suède) et M. Ryhage d'avoir bien voulu effectuer et interpréter pour moi des spectres de masse.

Je prie les Drs J.W. Pratt et N.K. Richtmyer, qui nous ont fourni des 3-désoxysucres, de trouver ici tous mes remerciements.

Certaines identifications n'ont pu être menées à bien que grâce à des examens aux rayons X, effectués par Mme S. Barbezat, que je remercie très vivement ici.

Je remercie M. le Professeur E. Aubel et Mme Y. Khouvine, Directeur de Recherches au C.N.R.S. pour la grande bienveillance qu'ils m'ont toujours témoignée.

Je tiens enfin à remercier tous mes camarades de laboratoire pour l'aide efficace qu'ils m'ont apportée, et particulièrement M.D. Mercier pour les nombreux services qu'il m'a toujours rendus avec la plus grande amabilité.



INTRODUCTION

Parmi les parasites intestinaux de l'homme et des animaux domestiques, les ascaris occupent une place prépondérante. Ils sont en effet universellement répandus et infestent un grand nombre d'individus. Ils sont reconnus depuis la plus haute antiquité comme la cause de maladies souvent violentes et graves et ils sont mentionnés dans les tous premiers écrits médicaux. Hippocrate lui-même a étudié leur mode de vie.

Les ascaris appartiennent à la classe des Nématodes, (embranchement des Némathelminthes, sous-règne des Métazoaires) ; il existe différentes races d'ascaris dont les principales sont : *Parascaris equorum* du cheval (ou *Ascaris megalocephala*), *Ascaris lumbricoides* du porc et *Ascaris lumbricoides* de l'homme. Ces deux dernières variétés sont anatomiquement et physiologiquement identiques, mais elles diffèrent par la spécificité de l'hôte, l'ascaris du porc ne pouvant se développer chez l'homme et réciproquement.

Les ascaris sont à l'origine de troubles extrêmement variés, provoqués soit par les substances toxiques qu'ils excrètent, soit par l'effet mécanique de leur présence. Dans le premier cas, on observe des inflammations, des nécroses, des perturbations des fonctions intestinales, des troubles nerveux. Dans le deuxième cas, les ascaris peuvent provoquer des fistules, des ulcères ou des abcès, et même, quand ils sont nombreux et de grande taille, des occlusions intestinales.

L'importance des ascaris en pathologie humaine et animale a donné lieu au cours des siècles à d'innombrables études zoologiques, physiologiques et médicales. Mais ce n'est qu'au début de ce siècle qu'ont paru les premiers travaux concernant leur chimie et leur biochimie.

Flury (1), le premier, a entrepris en 1912 l'étude chimique des ascaris. Il a analysé qualitativement et quantitativement leurs différents constituants et les résultats qu'il a obtenus ont servi de référence et de point de départ à toutes les recherches ultérieures.

Au cours de ce travail, il a décrit l'isolement d'un alcool gras à haut poids moléculaire, qui constitue la plus grande partie de l'insaponifiable des graisses d'*Ascaris lumbricoides*, et qu'il a appelé "alcool ascarylique".

Indépendamment et à la même époque, Fauré-Frémiot (2) a montré que la membrane interne de l'oeuf de *Parascaris equorum* est constituée par un corps gras particulier dont la saponification fournit un produit, l'"acide-alcool ascarylique", identique à l'"alcool ascarylique" de Flury.

Schulz et Becker (3) ont effectué en 1933 la première étude chimique proprement dite de l'"alcool ascarylique", mais leur travail n'a pas permis d'en élucider la structure.

Il est curieux de constater que, à part cette tentative isolée, aucune étude chimique de ce nouveau corps n'a été effectuée, malgré la facilité avec laquelle on peut se procurer de grandes quantités d'ascaris.

En 1954, le Professeur Fauré-Frémiet nous a suggéré de reprendre l'étude de la structure chimique de l'"alcool ascarylique", dont il nous a très aimablement fourni les premiers échantillons.

Nous avons pu mener à bien ce travail, qui fait l'objet de la présente thèse.

Nous avons d'abord montré que l'"alcool ascarylique" est en réalité un mélange de trois glycopipides, que nous avons appelé ascarosides A, B et C ; leurs formules respectives sont : $C_{34}H_{68}O_4 \pm CH_2$, $C_{37}H_{74}O_5$ et $C_{43}H_{84}O_8$.

L'hydrolyse acide des trois ascarosides fournit un seul et même sucre, inconnu jusqu'alors, que nous avons proposé d'appeler ascarylose.

Nous avons pu, d'une part déterminer la constitution des aglycones des trois ascarosides et, d'autre part, élucider la structure de ce nouveau sucre.

L'ascarylose, que nous avons obtenu à l'état cristallisé, a pour formule brute $C_6H_{12}O_4$. Nous avons montré qu'il appartient à une nouvelle classe de sucres qui n'avaient pas été décrits jusqu'alors : les 3,6-didésoxy-aldohexoses.

Quatre autres représentants de la même famille ont été isolés indépendamment, vers la même époque, par Westphal, Lüderitz, Staub, Davies et leurs collaborateurs, à partir de bactéries gram-négatives : ce sont l'abéquose (5, 6), le tyvelose (4, 6), le paratose (7) et le colitose (8).

La structure et la stéréochimie de ces sucres naturels ont été déterminées par synthèse*.

Nous avons synthétisé trois 3,6-didésoxy-hexoses : les 3,6-didésoxy D-arabino, D-ribo, et L-lyxo-hexoses**. Nous avons ainsi montré que l'ascarylose est le 3,6-didésoxy L-arabino-hexose, et que le tyvelose est son antipode optique. De la même manière, nous avons identifié le paratose comme étant le 3,6-didésoxy D-ribo-hexose. Le 3,6-didésoxy-lyxo-hexose, D ou L, n'a pas encore été trouvé dans la nature.

De leur côté, le Professeur Westphal et ses collaborateurs ont synthétisé le 3,6-didésoxy D-xylo-hexose, ce qui leur a permis d'identifier l'abéquose (série D) et son antipode optique, le colitose (série L).

Cette nouvelle famille de sucres naturels présente un intérêt particulier en immunologie. En effet, il a été démontré que les antigènes O de nombreuses bactéries gram-négatives contiennent un 3,6-didésoxy-hexose. Celui-ci occupe une position terminale, et joue de ce fait un rôle très important dans la spécificité de l'antigène (voir p. 58).

Dans l'exposé qui suit, nous décrirons successivement :

- la composition des lipides d'ascaris, et particulièrement de l'insaponifiable.

- les travaux antérieurs effectués sur l'"alcool ascarylique".

- les techniques que nous avons utilisées.

- les résultats de nos propres recherches.

- le rôle biologique des 3,6-didésoxyhexoses.

* Il existe théoriquement huit 3,6-didésoxy-hexoses, groupés en quatre paires d'antipodes optiques. Il suffisait de synthétiser un membre de chaque paire pour pouvoir identifier les cinq sucres naturels isolés jusqu'à présent.

** Voir la nomenclature p. 43.

LES LIPIDES D'ASCARIS

D'après les travaux de Flury (1), les lipides d'ascaris se distinguent de ceux des autres animaux par les propriétés suivantes :

- ils sont localisés principalement dans les organes reproducteurs de la femelle, où ils sont particulièrement abondants ; cela laisse supposer qu'ils jouent un rôle important dans le mécanisme de la reproduction de ces animaux.

- ils sont particulièrement riches en acides volatils.

- l'insaponifiable d'ascaris contient très peu de stérols ; il est constitué essentiellement par un alcool gras supérieur, l'"alcool ascarylique".

COMPOSITION DES LIPIDES TOTAUX -

Les recherches effectuées par Flury (1) sur des *Ascaris lumbricoides* du porc mâles et femelles ont montré que les lipides constituent 10,88 % du poids du corps sec (1,63 % des animaux frais). L'extrait éthéré d'ascaris contient 4,7 % de phospholipides et 95,3 % de lipides acétonosolubles qui ont la composition suivante :

Tableau I

	d'après Flury (1)	d'après Schulz et Becker (3)
Acides gras	65 %	65 %
Insaponifiable	24,72 %	26 %
Glycérol	2,4 %	8,8 %
Lipide peu caractérisé	7,8 %	

A - LES ACIDES GRAS -

Les acides gras se répartissent en 46,38 % d'acides saturés et 53,62 % d'acides insaturés (indice d'iode 75,20) (1).

a) Acides volatils

Les acides volatils sont particulièrement abondants dans les graisses d'ascaris*. Ils consistent en un mélange des acides C₂ à C₆ (saturés, insaturés et ramifiés), ce qui est tout à fait inhabituel dans les tissus gras-seux.

On trouve les acides volatils à l'état libre dans l'hémolymphe et dans les produits de fermentation ; ils existent sous forme d'esters dans les autres tissus.

* Ils sont deux fois plus abondants que dans la graisse de beurre (12a) qui est considérée comme une source riche en acides volatils.

Les acides volatils de l'hémolymph comprennent les acides acétique, propionique, α -méthylbutyrique, et des acides en C_6 ramifiés qui n'ont pas été identifiés. (Moyle et Baldwin (9)).

Les acides de fermentation sont constitués par de l'acide acétique (20 à 25 %), de l'acide propionique (10 %), des acides en C_4 (2 à 5 %), des acides en C_5 (40 %) et des acides en C_6 (20 à 30 %). Les acides en C_5 ont été identifiés aux acides n-valérianique (20 %), dl- α -méthylbutyrique (50 %) et cis- α -méthylcrotonique (tiglique) (30 %) (Bueding et Yale (10), Bueding (11)).

Les acides volatils estérifiés (que l'on rencontre dans les tissus reproducteurs, les œufs, les muscles et la cuticule) consistent en un mélange d'acides saturés (C_2 à C_6), avec prédominance des acides acétique, hexanoïque et pentanoïque (Fairbairn (12 a, 12 b, 12 c)).

La biogénèse de l'acide α -méthylbutyrique (qui est le constituant principal des acides de fermentation) a été étudiée par Saz et Weil (13)*.

B - L'INSAPONIFIABLE -

a) "L'alcool ascarylique".

L'"alcool ascarylique" est le principal constituant de l'insaponifiable (Tableau II). Il est particulièrement abondant dans les organes reproducteurs de la femelle, où sa concentration est deux fois et demie plus forte que dans les animaux entiers.

Tableau II

	% d'alcool ascarylique dans l'insaponifiable	% d'alcool ascarylique dans le tissu sec
Organes reproducteurs femelles	82 % (12 a)	4.75 % (*)
Animaux entiers des deux sexes	63 % (**)	1.70 % (**)

(*) Calculé d'après les chiffres de Fairbairn (12 a).

(**) Calculé d'après nos chiffres.

Rôle biologique de l'"alcool ascarylique".

Selon Fauré-Frémiet (2 a), l'"alcool ascarylique" est un produit caractéristique du métabolisme de l'oocyte et de l'œuf d'*Ascaris*. Cet auteur a en effet montré, en 1913, (2 b), que les grains réfringents, contenus dans le cytoplasme de l'oocyte, sont constitués par un corps gras fondant à 45°, dont la saponification fournit l'"alcool ascarylique" ; il a aussi montré que la membrane interne de l'œuf, ou membrane vitelline est essentiellement constituée par un dérivé d'"alcool ascarylique" fondant à 72°.

Fauré-Frémiet suppose que, après la fécondation de l'oocyte, le composé F.45° subit une saponification partielle et se transforme en composé F.72° pour former la membrane interne de l'œuf.

La résistance de cette membrane aux agents chimiques est remarquable : Fairbairn et Passey (14) ont montré qu'elle n'est pas attaquée par des réactifs tels que HCl 2N, NO_3H 2N, NaOH 2N, NH_4OH 0,5N, HCHO 3N et CNa 4N ; elle est, par contre, détruite par les solvants organiques et par la chaleur (elle fond vers 70°).

* Les travaux cités ci-dessus ont été effectués sur des *Ascaris lumbricoïdes*.

Ces faits prouvent que la membrane vitelline est responsable de la remarquable résistance et imperméabilité de l'œuf d'ascaris.

Ce rôle protecteur de la membrane est important, car l'œuf, après la fécondation, est excrété par l'hôte et doit séjourner un certain temps dans le milieu extérieur, où il peut subir toutes sortes d'agressions, avant d'être ingéré par un nouvel hôte, chez lequel il peut poursuivre son développement.

L'"alcool ascarylique" étant le constituant principal des lipides de la membrane vitelline (14), on peut supposer que la résistance et l'imperméabilité de l'œuf sont dues à sa présence.

Il faut noter que l'"alcool ascarylique" existe aussi dans les muscles et dans la cuticule, mais on ignore quel est son rôle dans ces tissus.

L'"alcool ascarylique" a également été isolé par Brand et Winkeljohn, à partir d'*Ascaris lumbricoides* mâles (15).

b) Les stérols.

En raison de l'abondance de l'"alcool ascarylique", les techniques utilisées avant 1945 n'ont pas permis de déceler la présence de stérols.

En 1945, Brand et Winkeljohn (15) ont cependant observé que l'insaponifiable d'ascaris donne une réaction de Liebermann faiblement positive.

En 1955 (12 a), Fairbairn a isolé pour la première fois des stérols, d'abord à partir des organes reproducteurs de la femelle, puis à partir d'autres tissus. Leur répartition est la suivante :

Tableau III

	Pourcentage de stérols dans l'insaponifiable	Pourcentage d'alcool ascarylique dans l'insaponifiable
Muscle	17 %	
Cuticule	12 %	
Organes reproducteurs	1,7 %	82 % (*)
Animaux entiers mâles et femelles	19 %	63 % (**)

(*) Chiffres de Fairbairn (12 a)

(**) Calculé d'après nos chiffres.

Les stérols des organes reproducteurs consistent en un mélange de composés saturés (25 %) et insaturés (75 %) (Fairbairn (12 a)) ; le composé insaturé a été isolé sous forme de dibromure et identifié au cholestérol (Fairbairn et Jones (16)).

C - SUBSTANCES NON IDENTIFIÉES -

Les lipides d'ascaris contiennent des substances non identifiées. Jennings (1949) (17), a étudié un lipide antigénique à haut poids moléculaire. Flury (1) avait trouvé dans l'hémolymphe une substance hémolytique qu'il pensait être l'acide oléique ; Masquelier et Bailenger (18) ont montré qu'il s'agissait d'une substance lipoprotéinique.

Nous ne traiterons pas ici les autres aspects de la chimie et de la biochimie des ascaris, qui ont été décrits par Fairbairn dans une revue détaillée (19).

TRAVAUX ANTÉRIEURS SUR LA STRUCTURE CHIMIQUE DE L'«ALCOOL ASCARYLIQUE»

Quand nous avons entrepris nos recherches sur l'"alcool ascarylique", peu d'études avaient été effectuées sur sa structure chimique, comme le montre le résumé des travaux antérieurs :

Flury (1) a isolé pour la première fois l'"alcool ascarylique" à partir de l'insaponifiable d'*Ascaris lumbricoides*. Les résultats de ses recherches sur la nature chimique de ce nouveau composé peuvent être résumés de la façon suivante : l'"alcool ascarylique" fond à 83° ; son poids moléculaire est de 536 ; l'obtention d'un dérivé dibromé indiquerait la présence d'une double liaison, et le résultat des analyses élémentaires concorderait avec la formule brute $C_{32}H_{64}O_2$.

L'"alcool ascarylique" résiste à une saponification énergique, ne donne pas les réactions colorées caractéristiques des stérols et se comporte comme un alcool supérieur. En présence d'acide sulfurique concentré, il donne une coloration brun-rouge, et, par chauffage au-dessus du point de fusion, il y a formation d'une substance à odeur d'acroléine.

En 1913, Fauré-Frémiet (2 b) a traité par l'acétone des ovaires de *Parascaris equorum* (*Ascaris megalocephala*) et a isolé ainsi un "composé ascarylique" cireux, jaune clair, fondant vers 40°. La saponification de ce composé a fourni une substance fondant à 82°, identique à l'"alcool ascarylique" de Flury ; Fauré-Frémiet l'a appelé "acide-alcool ascarylique" en raison des propriétés qu'il décrit ainsi : c'est un corps blanc, fondant vers 82°, cristallisable ; ses cristaux, obtenus par évaporation spontanée d'une solution méthanolique additionnée d'éther, sont des petites sphérules régulières formées de fines aiguilles agglomérées en masses radiaires, peu solubles à froid et très solubles à chaud dans tous les solvants des graisses. Ce composé se comporte comme un acide : il réagit au tournesol de façon nette mais faible, et forme avec les alcalis des savons solubles dans l'eau mais très dissociables, dont la solution est opalescente. Il se comporte également comme un alcool puisqu'il réagit avec l'anhydride acétique pour donner un dérivé acétylé.

Le résultat des analyses élémentaires a conduit Fauré-Frémiet à attribuer respectivement à l'"acide-alcool ascarylique" et à son dérivé acétylé les formules suivantes : $C_{20}H_{40}O_3$ et $C_{22}H_{42}O_4$.

En 1933, Schulz et Becker (3) ont entrepris l'étude de la structure chimique de l'"alcool ascarylique" et leurs résultats peuvent se résumer ainsi :

- l'"alcool ascarylique" fond à 84°, après cristallisation dans l'acétate d'éthyle.

- Il est soluble à chaud dans l'éther, le chloroforme et l'acétate d'éthyle, difficilement soluble dans l'éther de pétrole.

- La mesure du poids moléculaire et le résultat des analyses élémentaires permettent d'attribuer à l'"alcool ascarylique" la formule brute $C_{33}H_{68}O_4$.

- L'"alcool ascarylique" ne contient pas de double liaison ; c'est donc un corps saturé.

- Le dosage de Zerewetinoff montre la présence de deux hydroxyles ; l'obtention d'un dibenzoate F.37° et d'un diacétate F.57° montre que l'"alcool ascarylique" contient deux fonctions alcool acylables. Les deux autres oxygènes sont probablement engagés dans des fonctions éther car l'"alcool ascarylique" est récupéré inchangé après traitement par le réactif de Grignard.

- Par chauffage au-dessus du point de fusion, il se forme une substance à odeur d'acroléine, ce qui indiquerait la présence de glycérol dans la molécule d'"alcool ascarylique".

En 1950, Timm (20) a publié une note sur la composition chimique de la membrane vitelline des oeufs d'*Ascaris lumbricoides* ; après extraction par le dibromure d'éthylène, il a obtenu une substance cireuse F.72° ; il pense que cette substance est identique au palmitate de myricyle, à cause de la similitude des points de fusion des deux corps.

TECHNIQUES UTILISÉES

I - CHROMATOGRAPHIE

Au cours de ce travail, nous avons utilisé de façon constante les techniques de séparation chromatographiques, tant sur colonne que sur papier, à la fois comme méthode analytique et comme méthode préparative.

A - Chromatographie par adsorption.

Pour la séparation des substances lipidiques incolores, nous avons employé la technique du chromatogramme liquide ou "analyse par élution".

Selon les cas, nous avons utilisé comme adsorbant : a) l'alumine, pour les substances peu fragiles en milieu alcalin ; b) le trisilicate de magnésium pour les substances risquant de se saponifier ou de se dégrader.

L'alumine a été préparée de la façon suivante : 1 kg d'alumine commerciale est mis en suspension dans deux litres d'eau ; on acidifie par NO_3H jusqu'à ce que le pH reste aux environs de 2 pendant dix minutes, puis l'alumine est lavée à l'eau distillée par agitation et décantation, jusqu'à ce que les eaux de lavage soient neutres. L'alumine ainsi obtenue est ensuite séchée à 180° pendant quatre heures.

Le silicate de magnésium (Siegfried, Zofingen, Suisse) est mélangé à de la célite (en proportion 2 : 1) et mis en suspension dans l'eau ; le mélange est acidifié par l'acide acétique, puis essoré ; l'adsorbant est lavé plusieurs fois à l'eau chaude jusqu'à neutralité, lavé deux fois à l'acétone puis deux fois à l'éther, enfin séché à 150° pendant trois ou quatre heures.

Les solvants utilisés, formant une gamme à pouvoir éluant de plus en plus fort, sont les suivants : éther de pétrole distillé, benzène distillé et séché sur sodium, éther distillé, méthanol distillé, éther avec des proportions variables d'acide acétique. L'éther est remplacé par du chloroforme quand les substances à purifier sont insolubles dans l'éther.

Chromatographie à chaud.

Les substances peu solubles à température ordinaire ont été chromatographiées à chaud ; on emploie alors une colonne à double paroi, chauffée par les vapeurs d'un solvant à l'ébullition (en général l'éther). A 36° , nous avons utilisé la gamme des solvants suivants : tétrachlorure de carbone, benzène, chloroforme et méthanol.

B - Chromatographie de partage.

a) Chromatographie sur colonne.

- Les composés carboxylés lipidiques ont été chromatographiés sur acide silicique (Mallinckrodt), qui est utilisé sans préparation préalable, mais peut nécessiter parfois une activation par lavage au méthanol et chauffage à 110° pendant quelques heures.

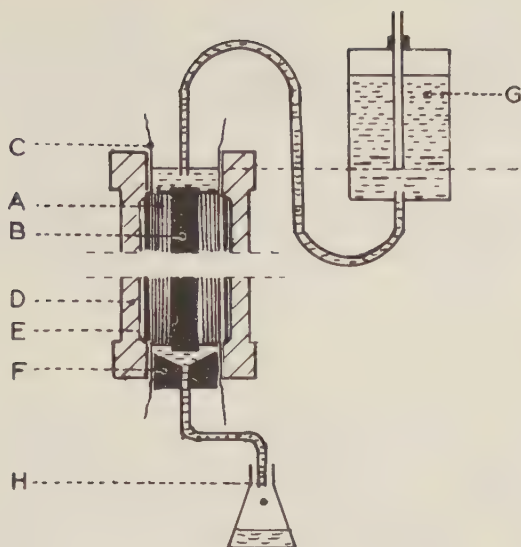


Figure 1

- Les sucres ont été purifiés par chromatographie sur colonne de cellulose pressurisée Chromax LKB (Stockholm), schématisée ci-dessus (fig. 1). Elle se compose d'un cylindre constitué par des feuilles de papier (A) enroulées autour d'un axe de polythène (B), le tout contenu dans une enveloppe de polythène (C).

Ce cylindre est introduit dans une chemise de même diamètre à double paroi, la paroi externe étant en acier (D) et la paroi interne en caoutchouc (E). Le bouchon de polythène (F) est introduit dans l'enveloppe du cylindre de cellulose ; il est traversé par un tuyau de polythène qui sert à recueillir les éluats.

On règle la vitesse d'écoulement en faisant varier le niveau de liquide en haut de la colonne, (maintenu constant grâce à un flacon de Mariotte (G)), ainsi que le niveau (H) du tuyau d'écoulement.

Pour obtenir une bonne séparation, il est nécessaire que la colonne de cellulose soit homogène, donc que la pression du papier soit la même dans toute son épaisseur. Pour cela, on comprime plus ou moins le cylindre de papier (A) grâce à la paroi de caoutchouc (E), en faisant varier la pression de l'air entre les parois D et E.

Pour vérifier que la compression désirée est obtenue, donc que la colonne est homogène, on procède de la façon suivante : on fait passer à travers la colonne une petite quantité de liquide coloré ; on ôte le bouchon (F) et on observe l'apparence de la face inférieure du cylindre de papier au moment où le colorant la traverse. D'après la forme de la zone colorée, on peut juger si la pression exercée est correcte ; si celle-ci est trop forte, la zone colorée se présente comme sur la figure 2 (a) ; si elle est trop faible, comme sur la figure 2 (b) ; si la pression est correcte, la surface inférieure doit se colorer d'un seul coup, ou du moins très rapidement, figure 2 (c).

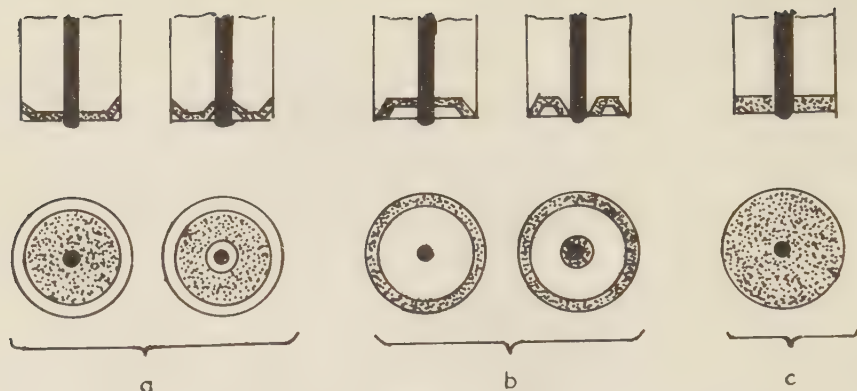


Figure 2

Avant usage, il est nécessaire de laver la colonne avec au moins un litre et demi du solvant que l'on compte utiliser (dans notre cas, l'acétone contenant 5 % d'eau).

Les éluats sont recueillis par petites fractions et évaporés au fur et à mesure, afin de suivre le déroulement de la chromatographie.

On peut utiliser plusieurs fois la même colonne, à condition, bien entendu, de la laver soigneusement avec le solvant choisi, avant de s'en servir à nouveau.

Les dimensions de la colonne que nous avons utilisée sont les suivantes : hauteur du cylindre de papier : 36 cm, diamètre 6 cm, diamètre du noyau de polythène : 2,5 cm.

Les séparations ainsi effectuées ont été satisfaisantes : nous avons en effet obtenu le tyvelose et l'ascarylose à l'état pur, ce qui nous a permis de les faire cristalliser, alors que cela n'avait pas été possible après chromatographie ordinaire sur poudre de cellulose Whatmann.

b) Chromatographie sur papier ascendante ou descendante.

L'analyse qualitative de mélanges de sucres ou de produits hydroxylés a été effectuée par chromatographie sur papier Whatmann n° 1, soit descendante, soit ascendante. Les mélanges de solvants les plus couramment utilisés ont été : butanol-éthanol-eau (5 : 1 : 4) et butanol-pyridine-eau (6 : 4 : 3). Comme révélateur, nous avons employé le phtalate acide d'aniline (21) dans le cas des sucres réducteurs ; les substances polyhydroxylées (hexitols) ont été révélées par le système acide périodique-benzidine selon la technique de Cifonelli et Smith (22), modifiée par Gordon, Thornburg et Werum (23) ; cette méthode de révélation est basée sur l'oxydation périodique des α -glycols.

Les acides gras volatils ont été chromatographiés soit sous forme d'hydroxamates et révélés par le chlorure ferrique (26), soit sous forme de leurs sels d'éthylamine selon (27) et révélés par le vert de bromocrésol.

c) Chromatographie sur papier circulaire.

Nous avons également utilisé la chromatographie circulaire (24) dont le principe est le suivant : sur une feuille de papier circulaire ($\phi \approx 20$ cm), on dépose à égales distances du centre (5 mm) les gouttes de solutions des substances à séparer. Le solvant arrive au centre de la feuille par un capillaire sur lequel celle-ci repose, et diffuse par capillarité ; les substances se séparent en secteurs de couronnes concentriques le long du rayon sur

lequel elles ont été déposées. Le tout est enfermé dans une cuve étanche, en pyrex.

Cette technique a l'avantage d'être plus rapide que les techniques habituelles (décrites ci-dessus) ; le développement d'un chromatogramme ne nécessite en effet qu'une ou deux heures au lieu de dix à douze heures.

Nous avons utilisé la chromatographie circulaire pour séparer et identifier les 2,4-dinitrophénylhydrazones, selon la méthode de Horner et Kirmse (25) ; cette méthode consiste à imprégner le papier avec la diméthylformamide qui constitue la phase stationnaire, la phase mobile étant la décaline.

II - TECHNIQUES ANALYTIQUES

Les points de fusion ont été déterminés à l'aide de l'appareil de Kofler qui donne les températures corrigées.

Les dosages d'acidité ont été effectués avec une ultramicroburette Gilmont sur les solutions chloroformiques des acides (2 à 6 mg), en présence de phénol-phtaléine, par le potasse 0,1 N méthanolique.

Les dosages de la fonction α -glycol ont été effectués par l'acide périodique ou le périodate de sodium suivant la technique de Fleury et Lange (28) sur des quantités de substances de l'ordre de 15 à 30 milligrammes. Cette technique est d'une grande importance dans la chimie des sucres, car elle permet, en variant les conditions de l'oxydation (pH, température, temps) ou les modalités d'emploi, (avant ou après hydrolyse, avant ou après méthylation), d'obtenir de nombreux renseignements sur la structure des sucres ou des polyosides traités.

Les microdosages de carbone et hydrogène, d'azote (selon Dumas) de méthoxyle (selon Zeisel), de C-méthyle (selon Kuhn-Roth) et d'hydrogène mobile (selon Zerewetoff), ainsi que les microdéterminations de poids moléculaire selon Rast ont été effectués dans les laboratoires de microanalyse de la Ciba (Bâle), (directeur Dr. Gysel), de Firmenich (Genève) et de la Faculté de Médecine de Paris, (directeur Mme Abramson).

Nous avons mesuré les pouvoirs rotatoires, soit avec un polarimètre de Jobin et Yvon (raie J de la lampe à vapeur de mercure) soit avec un polarimètre de Hilger (raie D de la lampe à vapeur de sodium). Nous avons en général utilisé un tube de 0,5 décimètre de long.

Les spectres ultraviolets ont été mesurés soit avec un spectrophotomètre Beckmann, modèle DU, soit avec le spectrophotomètre Jobin et Yvon.

Les spectres d'absorption infrarouges ont été mesurés soit avec un appareil de Perkin Elmer au laboratoire de spectrographie infrarouge de la Ciba (directeur Dr Ganz), soit avec un appareil de Baird, par Madame Houelle, au laboratoire de spectrographie infrarouge de la Faculté de Pharmacie de Paris (directeur Professeur Guy).

Les spectres de masse ont été effectués à Stockholm dans le laboratoire du Professeur Stenhagen.

Les diagrammes de rayons X ont été effectués par Madame S. Barbezat, au laboratoire des rayons X du C. N. R. S. (directeur : Professeur J. Trillat).

III - TECHNIQUES DIVERSES

Pour la distillation de petites quantités de substances, nous avons utilisé un tube à boules chauffé dans un bain d'air, grâce à une boîte métallique munie de voyants en mica, dans laquelle plongent des thermomètres indiquant la température approximative de la distillation ; on fait le vide dans le tube en le branchant directement sur une pompe à vide.

RÉSULTATS DE NOS PROPRES TRAVAUX

PARTIE THÉORIQUE

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET DESCRIPTION DES ASCAROSIDES

I - ISOLEMENT DE L'"ALCOOL ASCARYLIQUE"

Nous avons effectué nos premières recherches sur un échantillon d'"alcool ascarylique", aimablement fourni par le Professeur Fauré-Frémiet.

Par la suite, nous avons procédé nous-même à l'extraction d'ascaris provenant de chevaux tués aux abattoirs.

La technique d'extraction employée par Fauré-Frémiet (2 a) ainsi que par Schulz et Becker (3) consiste à épuiser par l'acétone, après les avoir desséchés et broyés, les ovaires d'ascaris ou les animaux entiers.

Afin d'éviter les accidents allergiques qui risquent de se produire au cours de ces manipulations (3), nous avons traité les animaux entiers par la potasse à 10 %, à chaud, ce qui a pour effet de les désagréger. Nous avons ensuite épuisé à l'éther et saponifié l'extrait éthéré par la potasse méthanolique 2 N, afin d'éliminer les substances saponifiables qui auraient pu résister au traitement par la potasse aqueuse.

L'insaponifiable ainsi obtenu représente 0,3 % du poids des animaux frais ; par cristallisation dans l'acétate d'éthyle ou dans un mélange éther-chloroforme, on obtient l'"alcool ascarylique" sous forme de sphérules incolores.

II - SEPARATION DE L'"ALCOOL ASCARYLIQUE" EN ASCAROSIDES A, B et C

La chromatographie de l'"alcool ascarylique" sur alumine (à 37°) montre qu'il s'agit en réalité d'un mélange de trois substances, que nous avons d'abord appelées, suivant l'ordre d'élution, alcools ascaryliques A, B et C, (29). Par la suite, en tenant compte de leur structure, nous les avons appelées plus justement ascarosides A, B et C (30).

L'"alcool ascarylique" contient 20 % d'ascaroside A, 67 % d'ascaroside B et 13 % d'ascaroside C*.

* Ces chiffres concernent l'"alcool ascarylique" que nous avons extrait de *Parascaris equorum*.

Nous avons également traité, dans les mêmes conditions, des *Ascaris lumbr.* de l'homme, que nous a très aimablement envoyés M. Roels ; nous avons ainsi obtenu un mélange contenant 18 % d'ascaroside A, 74 % d'ascaroside B et 8 % d'ascaroside C. Nous avons par ailleurs chromatographié un échantillon d'insaponifiable (aimablement fourni par le Dr. Fairbairn), provenant de membranes vitellines d'*Ascaris lumbr.* du porc ; nous avons alors obtenu un mélange de 64 % d'ascaroside A, 25 % d'ascaroside B et 10 % d'ascaroside C.

Les formules brutes et les constantes des trois ascarosides sont les suivantes :

Ascaroside A	$C_{34}H_{68}O_4 \pm CH_2$	F. 79 - 80°	$[\alpha]_D = -55^\circ$
Ascaroside B	$C_{37}H_{74}O_5$	F. 82 - 83°	$[\alpha]_D = -49^\circ$
Ascaroside C	$C_{43}H_{84}O_8$	F. 93 - 95°	$[\alpha]_D = -77,5^\circ$

Les conditions d'extraction que nous avons employées étant très énergiques, nous avons tenu à vérifier que nous obtenons les mêmes substances en extrayant les ascaris par l'acétone selon la technique de Schulz et Becker (3).

D'une part, la chromatographie de l'extract acétonique brut a permis d'isoler directement de l'ascaroside B, qui existe donc à l'état libre, ce que Schulz et Becker avaient déjà constaté (3).

D'autre part, la saponification de l'extract acétonique, suivie d'une chromatographie de l'insaponifiable, a fourni les ascarosides A, B et C.

Ces trois substances nouvelles peuvent donc être isolées indifféremment par l'une ou l'autre méthode.

III - PROPRIETES COMMUNES AUX TROIS ASCAROSIDES

Les trois ascarosides ont les mêmes caractères de solubilité; ils sont insolubles dans l'éther de pétrole, peu solubles dans le benzène, l'éther, l'alcool, l'acétone, l'acétate d'éthyle, solubles dans le chloroforme et dans la pyridine. Ils cristallisent dans un mélange de chloroforme et d'éther en sphérules régulières et incolores.

Les trois ascarosides sont lévogyres. Ils sont saturés, ne contiennent pas de méthoxyle et ne montrent pas d'absorption dans l'ultraviolet; leurs spectres infrarouges révèlent une large bande à 3,0 μ caractéristique de fonctions alcool; des bandes de la région de 8,3 μ à 10,5 μ , notamment celle à 8,79 μ , pourraient correspondre à la présence d'une liaison C-O-C (fig. 3); il n'y a pas de bande CO.

Les trois ascarosides ne contiennent pas de fonction α -glycol, car ils ne sont pas attaqués par le tétracétate de plomb. Ils résistent également à l'action de l'hydrure de lithium et d'aluminium.

Les trois ascarosides, insaponifiables, sont hydrolysés en milieu acide en une partie lipidique et une partie hydrosoluble.

Nous avons pu montrer que cette partie hydrosoluble est constituée par un seul sucre réducteur; ce sucre est le même pour les trois ascarosides, ce qui ressort de l'examen des R_f , des pouvoirs rotatoires, des analyses élémentaires, des spectres infrarouges et des dérivés cristallisés (voir p. 83).

Nous avons appelé ce sucre l'ascarylose. L'étude de sa structure est décrite dans le chapitre V, p. 33.

L'ascaroside A et l'ascaroside B contiennent une molécule d'ascarylose, tandis que l'ascaroside C en contient deux.

Nous l'avons montré en effectuant un dosage colorimétrique de sucre selon Johanson (31): après chauffage en présence d'anthrone en solution sulfurique, l'ascarylose et les trois ascarosides montrent un maximum d'absorp-

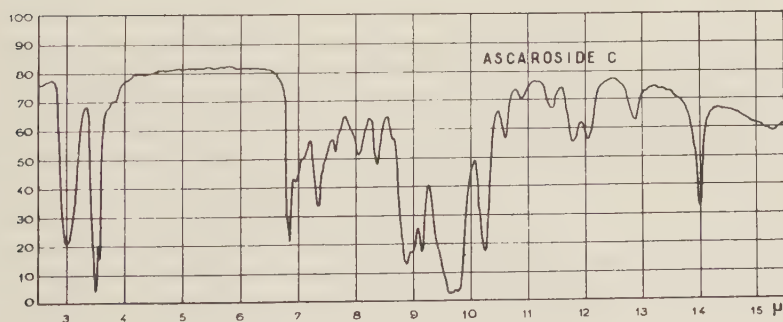
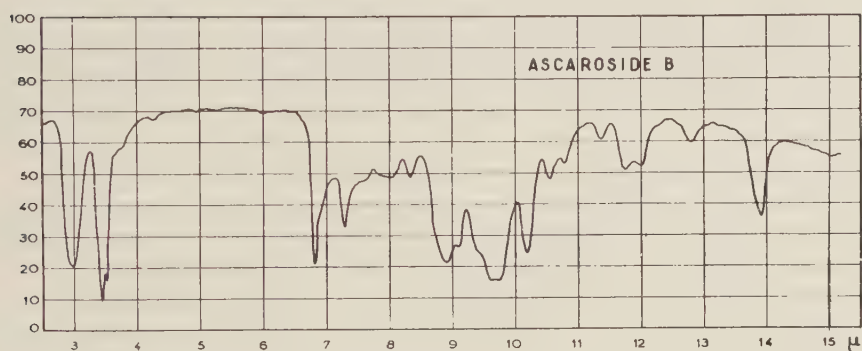
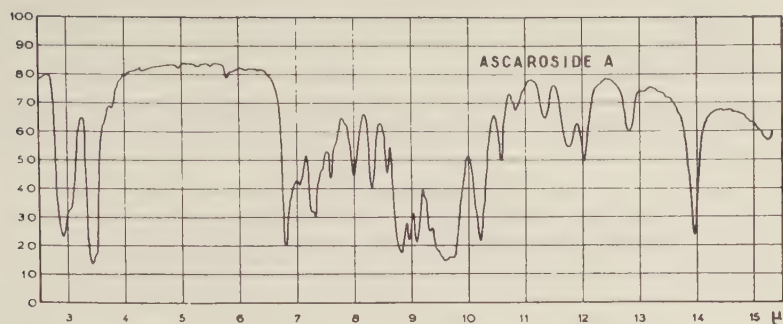


Figure 3 - Spectres infrarouges mesurés avec un Perkin-Elmer double beam ; substances à l'état fondu et resolidifié.

a) ascaroside A - b) ascaroside B - c) ascaroside C.

tion de la lumière visible à 490 m μ . Les intensités d'absorption mesurées ont été comparées à celles d'une courbe de référence établies avec des quantités connues d'ascarylose.

Les pourcentages de sucre trouvés sont représentés dans le tableau ci-dessous :

Tableau IV
Teneur en ascarylose des trois ascarosides

Substance	Formule brute	% d'ascarylose	
		calculé pour 1 mole d'ascarylose	trouvé
Ascaroside A	C ₃₄ H ₆₈ O ₄	27.4	27.2
Ascaroside B	C ₃₇ H ₇₄ O ₅	24.8	23.5
Ascaroside C	C ₄₃ H ₈₄ O ₈	20.3	39.4

CHAPITRE II

ASCAROSIDE A

I - PROPRIETES DE L'ASCAROSIDE A

L'ascaroside A (I) constitue la première fraction éluee lors de la chromatographie de l'"alcool ascarylique". Il est difficile à cristalliser, et se présente le plus souvent comme une pâte fondant vers 80°. Ses préparations les plus pures fondent à 79-80°, après cristallisation dans un mélange d'éther et de chloroforme, et se présentent comme une poudre microcristalline incolore.

Les analyses élémentaires et le dosage de poids moléculaire selon Rast s'accordent avec la formule brute $C_{34}H_{68}O_4 \pm CH_2$. Le dosage de Kuhn-Roth montre que l'ascaroside A possède trois groupements C-CH₃.

L'ascaroside A possède deux fonctions alcool, qui sont mises en évidence par la préparation d'un diacétate (II), $C_{38}H_{72}O_6 \pm CH_2$, F. 50°, dont le spectre infrarouge ne révèle plus de bande OH.

L'hydrolyse acide de l'ascaroside A fournit d'une part l'ascarylose, $C_6H_{12}O_4$, d'autre part un aglycone (III), que nous avons purifié par chromatographie sur alumine.

II - PROPRIETES ET DERIVES DE L'AGLYCONE A (III)

L'aglycone A se présente, après cristallisation dans un mélange d'éther et de chloroforme, sous forme de cristaux incolores, dont les préparations les plus pures fondent à 72°, $[\alpha]_D = -3^\circ$ (dans le chloroforme). Les analyses élémentaires sont en bon accord avec la formule d'un monoalcool $C_{28}H_{56}O \pm CH_2$; le spectre infrarouge montre une bande OH à 3,0 μ . Le dosage de Kuhn-Roth met en évidence la présence de deux C-CH₃.

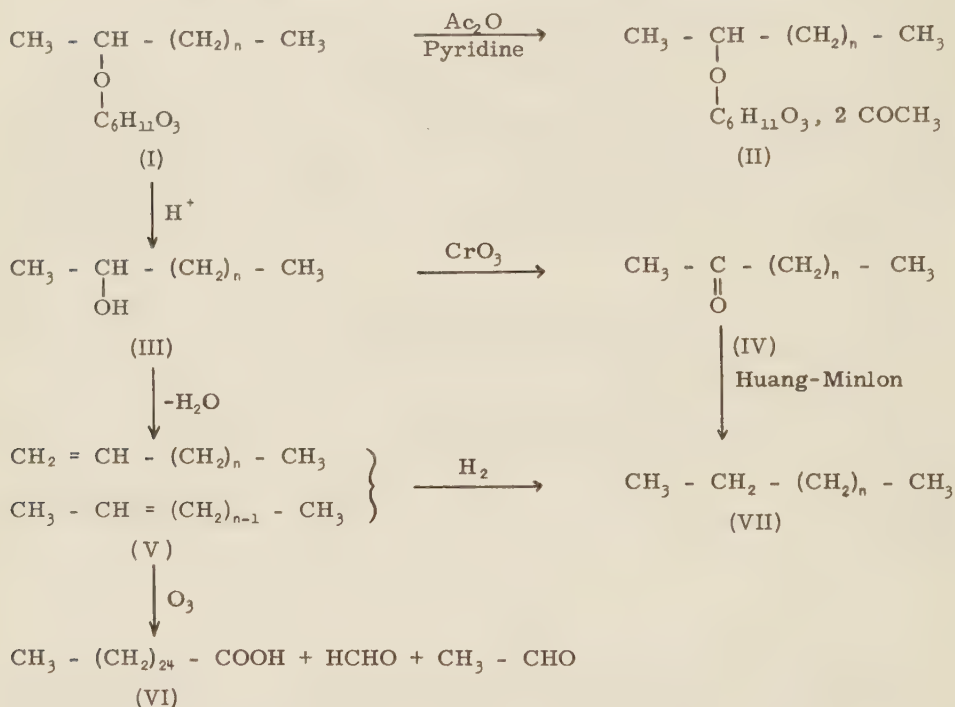
L'oxydation chromique de cet alcool fournit une cétone $C_{28}H_{56}O \pm CH_2$ (IV), F. 64° dont le spectre I.R. ne montre plus de bande OH mais révèle une bande CO à 5,8 μ . Il est peu probable qu'il s'agisse d'un aldéhyde, car l'oxydation a été effectuée en présence d'un excès de réactif. L'aglycone A est donc un alcool secondaire.

La déshydratation de cet alcool conduit à un mélange de carbures insaturés $C_{28}H_{56} \pm CH_2$ (V) qui cristallisent dans l'acétone en pailettes incolores F. 53°. Le spectre I.R. ne montre plus de bande OH, mais montre une bande à 10,38 μ caractéristique des doubles liaisons "trans".

L'ozonisation de ce mélange de carbures fournit comme produits volatils le formaldéhyde et l'acétaldéhyde, identifiés par chromatographie sur papier de leurs dinitrophénylhydrazones; l'obtention de ces composés indi-

que le produit ozonisé est un mélange de deux carbures, l'un ayant la double liaison en 1-2, l'autre en 2-3. La fonction alcool de l'aglycone A se trouve donc sur le carbone 2, l'aglycone A est par conséquent un méthyl carbinol. Par ailleurs, la chromatographie du mélange réactionnel, débarrassé des produits volatils fournit l'acide n-hexacosanoïque (VI), identifié par ses analyses, par son poids moléculaire (mesuré par acidimétrie), par son diagramme de diffraction des rayons X et par celui de son sel de plomb ; le manque de netteté de ces diagrammes indique cependant que cet acide n'est pas pur.

Dérivés et réactions de dégradation de l'ascaroside A*



Afin de connaître la longueur exacte de la chaîne carbonée de l'aglycone A, nous avons préparé le carbure saturé correspondant, afin de pouvoir étudier son diagramme de diffraction des rayons X.

Le carbure saturé (VII) a été préparé par hydrogénation sous pression du carbure insaturé (V) en présence d'oxyde de platine. Il a été purifié par chromatographie sur alumine et chauffage dans l'acide sulfurique à 130°. Il se présente, après cristallisation, sous forme de paillettes brillantes fondant à 60-62°. Son spectre I.R. ne montre plus la bande caractéristique des doubles liaisons à 10,38 μ . Le diagramme de diffraction des rayons X de ce carbure a malheureusement donné des résultats incohérents.

Nous avons pensé que le carbure insaturé, et par conséquent le carbure saturé, pouvait être un mélange dû à une déshydratation trop brutale de l'aglycone A, ce qui expliquerait l'incohérence des diagrammes des rayons X.

* Ces formules représentent un mélange de composés homologues, où n varie de 23 à 27

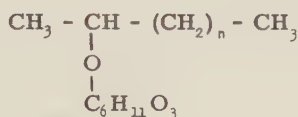
Nous avons donc préparé un nouvel échantillon de carbure saturé en réduisant la cétone $C_{28}H_{58}O$ (IV) selon la méthode de Huang-Minlon (32) ; le diagramme de rayons X du carbure ainsi obtenu n'apportait pas davantage de renseignements.

Nous avons alors envoyé un échantillon d'aglycone A au Professeur Stenhagen qui a bien voulu en faire le spectre de masse.

Les résultats obtenus montrent que l'aglycone A est un mélange, constitué de méthyl-carbinols secondaires non ramifiés, homologues, de C_{26} à C_{30} , avec prédominance de l'alcool en C_{30} ; la formule $C_{28}H_{58}O$ est donc une formule moyenne. Ceci explique les difficultés que nous avons eues à faire cristalliser l'ascaroside A, ainsi que l'incohérence des diagrammes de rayons X.

III - FORMULE PARTIELLE DE L'ASCAROSIDE A

Etant donné les résultats qui précèdent, on peut attribuer au mélange qui constitue l'ascaroside A la formule partielle suivante (où n varie de 23 à 27)



I

CHAPITRE III

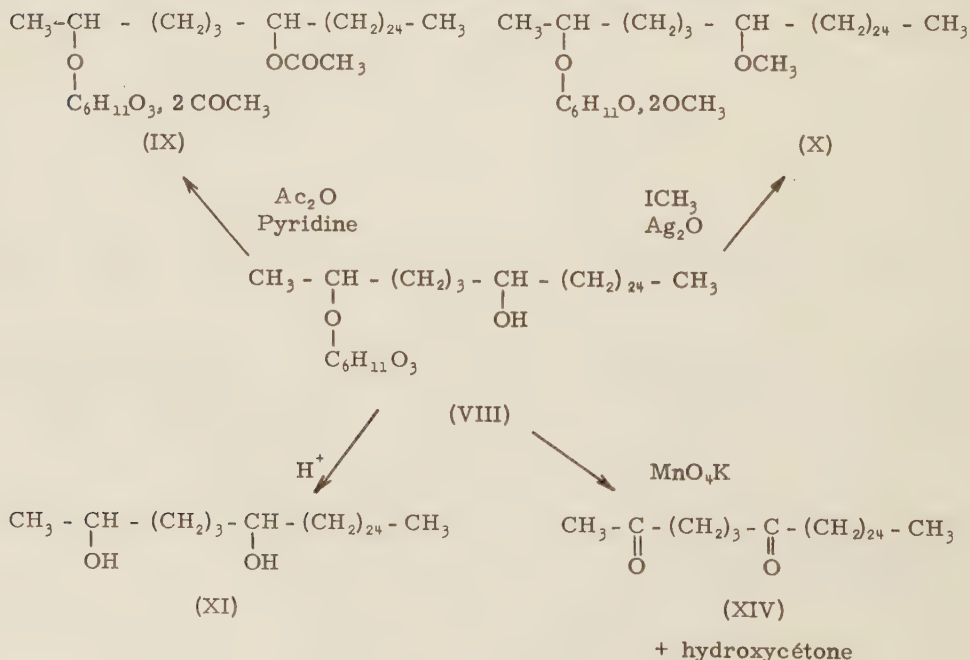
ASCAROSIDE B

I - PROPRIETES ET DERIVES DE L'ASCAROSIDE B

L'ascaroside B (VIII), deuxième fraction obtenue par chromatographie de l'"alcool ascarylique", cristallise dans un mélange d'éther et de chloroforme, en sphérules incolores fondant à 83-84°, $(\alpha)_D = -49^\circ$ (dans CHCl_3) ; les analyses élémentaires, la détermination de poids moléculaire et les résultats de dégradation décrits ci-dessous permettent de lui attribuer la formule brute $\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{O}_5$. Le dosage de Kuhn-Roth montre la présence de trois groupements $\text{C}-\text{CH}_3$. Son spectre infrarouge est décrit p. 19.

L'acétylation de l'ascaroside B par l'anhydride acétique dans la pyridine permet d'isoler deux substances fondant respectivement à 72° et 48°, dont les analyses élémentaires sont en bon accord respectivement avec les formules d'un monoacétate $\text{C}_{39}\text{H}_{76}\text{O}_6$ et d'un diacétate $\text{C}_{41}\text{H}_{78}\text{O}_7$.

Dérivés et réactions de dégradation de l'ascaroside B



Une acétylation plus énergique conduit à un triacétate F. 51° (IX), $C_{43}H_{80}O_8$, dont le spectre infrarouge ne montre plus de bande OH.

L'ascaroside B est donc un triol. La présence de trois hydroxyles libres dans l'ascaroside B est confirmée par la formation d'un triéther méthylrique F. 48°, le triméthyl-O-ascaroside, $C_{40}H_{80}O_5$ (X), dont le spectre infrarouge ne révèle pas de bande OH ; le dosage de Zeisel montre la présence de trois méthoxyles.

L'ascaroside B, chauffé dans du méthanol contenant 2 % de ClH 6N est scindé en une molécule d'un aglycone lipidique F. 94°, (XI) $C_{31}H_{64}O_2$, et une molécule d'ascarylose $C_6H_{12}O_4$.

II - PROPRIETES ET DERIVES DE L'AGLYCONE B (XI)

Après avoir chromatographié l'aglycone B sur alumine, nous l'avons obtenu sous forme de cristaux incolores F. 94° ; les analyses élémentaires concordent avec la formule $C_{31}H_{64}O_2 \pm 2CH_2$. Le spectre infrarouge de cette substance montre une forte bande OH et ne révèle pas de bande CO. Le dosage de C-CH₃ d'après Kuhn-Roth montre que l'aglycone B contient deux des trois groupements C-CH₃ décelés dans l'ascaroside B.

L'aglycone B est un diol, ce qui est prouvé par l'obtention de deux dérivés : un diacétate $C_{33}H_{68}O_4$ (XII), F. 52° - 53°, et un di-éther méthylrique $C_{33}H_{66}O_2$ (XIII), F. 52° ; les spectres infrarouges de ces deux substances ne montrent plus de bande OH.

L'oxydation chromique de l'aglycone B donne une dicétone F. 100 - 101° (XIV), $C_{31}H_{60}O_2$, dont nous avons préparé la dioxime $C_{31}H_{62}O_2N_2$. L'oxydation ayant été effectuée avec un excès d'oxydant, la présence de groupements aldéhydiques dans la substance F. 100-101° est exclue. L'aglycone B est donc un diol secondaire, qui doit avoir une chaîne normale (2 C-CH₃ d'après le dosage de Kuhn-Roth). Le spectre ultra-violet de la dicétone ne montre aucune absorption caractéristique, ce qui exclut la présence d'un groupement β-cétonique, et par conséquent la position en 1-3 des hydroxyles de l'aglycone B.

L'oxydation de l'aglycone B par le permanganate de potassium donne une hydroxycétone F. 87-88° (monoxime F. 88°, $C_{31}H_{63}O_2N$). L'oxydation chromique de l'hydroxycétone F. 87-88° donne la dicétone F. 100 - 101° $C_{31}H_{60}O_2$ (XIV), mentionnée ci-dessus.

On obtient également l'hydroxycétone et la dicétone (XIV) lors de l'oxydation de l'ascaroside B par le permanganate de potassium.

La précision des analyses élémentaires ne permettant pas d'établir les formules de l'aglycone et de ses dérivés avec une marge d'erreur inférieure à 2 CH₂, nous avons cherché à déterminer le nombre exact des carbones de l'aglycone B en transformant celui-ci en carbure saturé pour en étudier le diagramme de diffraction des rayons X. Dans ce but, nous avons soumis la dicétone F. 100° (XIV), dérivée de l'aglycone B, à la réduction selon Huang-Minlon (32) et nous avons isolé ainsi un hydrocarbure F. 69° (XV). Nous avons, d'autre part, synthétisé le carbure normal $C_{31}H_{64}$, F. 68 - 69°, par réduction de la palmitone, et le carbure normal $C_{32}H_{66}$, F. 68-69°, par une réaction de Wurtz sur l'iodure de cétyle. La comparaison des spectres de diffraction des rayons X de ces trois carbures a permis d'identifier l'hydrocarbure naturel à l'hentriacontane, $C_{31}H_{64}$. L'aglycone B (XI) est donc un di-hydroxyhentriacontane, $C_{31}H_{64}O_2$.

III - DEGRADATION DE L'AGLYCONE B

Afin de localiser les fonctions alcool de l'aglycone B, nous avons effectué sur celui-ci les réactions de dégradation suivantes :

La déshydratation de l'aglycone B par l'acide β -naphtalène sulfonique conduit à un diène (ou mélange de diènes) F. 57-58°, $C_{31}H_{60}$ (XVI). Le spectre ultraviolet de ce carbure ne montre aucune absorption caractéristique, les deux doubles liaisons ne sont donc pas conjuguées. Les positions 1,2 et 1,3 des hydroxyles de l'aglycone B ont été exclues ; l'absence totale de conjugaison dans le diène rend peu probable la position en 1,4 des deux hydroxyles.

L'ozonisation du diène $C_{31}H_{60}$ (XVI) nous a permis d'isoler plusieurs composés :

Les produits volatils, dès leur formation, ont été entraînés par un courant d'azote dans une solution aqueuse de sulfate de 2,4-dinitro-phénylhydrazine. Le précipité obtenu a été chromatographié sur papier selon Meigh (33) et identifié à la 2,4-dinitrophénylhydrazone d'acétaldéhyde. La présence d'autres aldéhydes ou cétones volatils n'a pas pu être décelée.

Parmi les produits hydrosolubles formés après décomposition oxydante de l'ozonide, nous avons isolé l'acide succinique qui a été identifié par son point de fusion (pas d'abaissement du point de fusion de mélange avec l'acide succinique authentique) et par chromatographie sur papier selon Löffler et Reichl (34) ; grâce à cette dernière technique, nous avons également pu déceler la présence d'acide malonique.

Les acides éthérosolubles formés ont été méthylés par le diazométhane. Deux esters méthyliques cristallisés ont été isolés après chromatographie sur silicate de magnésium :

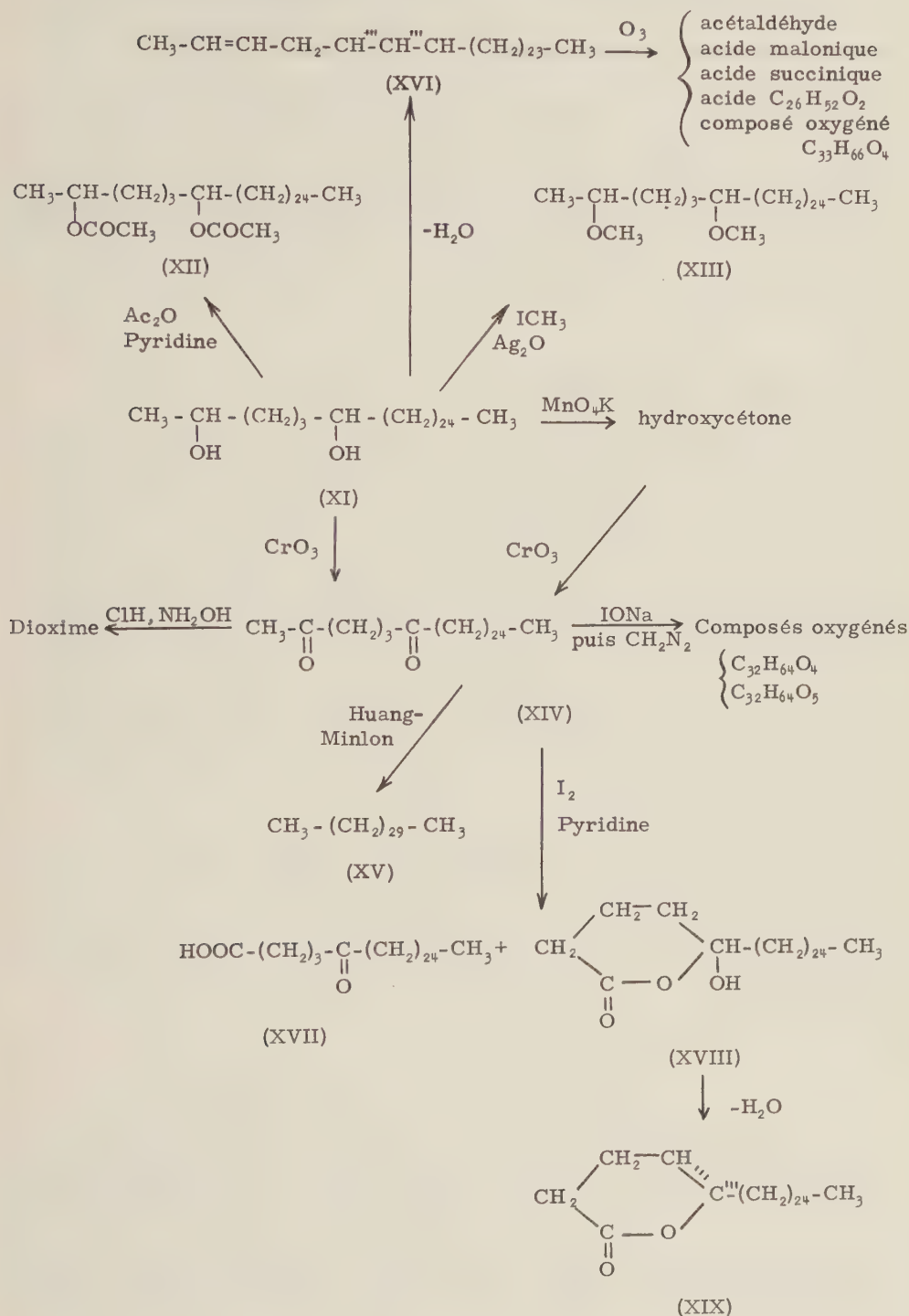
a) Un ester gras supérieur, F. 61-62°, $C_{27}H_{54}O_2 \pm CH_2$ (rendement 12 à 25 %). Sa saponification conduit à un acide F. 81-82° dont les analyses élémentaires et le poids moléculaire déterminé par titration s'accordent avec la formule $C_{26}H_{52}O_2 \pm CH_2$.

b) Un ester plus oxygéné F. 75-76°, dont les analyses élémentaires indiquent une formule brute $C_{31}H_{62}O_4$ ou $C_{33}H_{66}O_4$. Le dosage selon Zeisel montre la présence de deux méthoxyles. Il pourrait s'agir d'un ester méthylique contenant une fonction méthylalcoyleperoxyde ($R-OO-CH_3$), car le spectre infrarouge de cette substance montre une bande à 11,3 μ caractéristique de ce groupement. Nous n'avons pas poursuivi l'étude de ce composé.

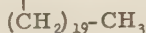
L'obtention d'acétaldéhyde par ozonisation du diène F. 57-58° indique que celui-ci contient un groupement $-CH=CH-CH_3$ qui pourrait provenir de la déshydratation d'un des deux groupements $-CHOH-CH_3$ ou $-CH_2-CHOH-CH_2-CH_3$ présent dans l'aglycone B.

Pour élucider ce problème, nous avons eu recours à la méthode de Bickel, Schmid et Karrer (35) de détermination de C-alcoyle. Cette méthode est une modification du dosage de Kuhn-Roth ; elle consiste à oxyder une substance par de l'acide chromique et à distiller les acides volatils au fur et à mesure de leur formation. Les sels d'éthylamine de ces acides sont ensuite chromatographiés sur papier selon (27), ce qui permet leur identification.

* La formation de formaldéhyde a d'autre part été mise en évidence lors de l'ozonisation du méthoxyhentriacontène (XXI).



Nous avons d'abord vérifié que, dans les conditions d'oxydation employées, de longues chaînes d'au moins dix-huit atomes de carbone ne sont pas dégradées jusqu'aux acides inférieurs entraînables à la vapeur d'eau : nous avons en effet oxydé selon cette technique l'acide stéarique, l'acide béhénique, et l'acide $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_{20}-\text{CHOH}-\text{CH}-\text{COOH}$ (36), et nous n'avons pas



isolé d'acides volatils (on sait que ces composés fournissent l'acide acétique par oxydation énergique selon Kuhn-Roth).

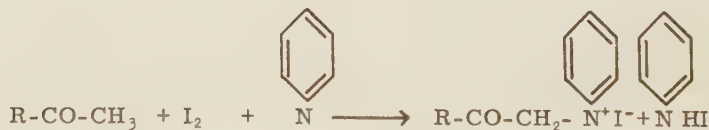
L'aglycone B (XI) et la dicétone (XIV) correspondante ont donc été soumis à l'oxydation selon Bickel, Schmid et Karrer (35) ; dans les deux cas nous n'avons décelé que l'acide acétique, mais pas l'acide propionique qu'aurait donné le groupement $-\text{CHOH}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$. On peut en déduire que l'aglycone B possède le groupement $-\text{CHOH}-\text{CH}_3$ et que la dicétone (XIV) est une méthylcétone $\text{R}-\text{CO}-\text{CH}_3$.

IV - FORMULE DEVELOPPEE DE L'AGLYCONE B

Afin de vérifier ce résultat, nous avons soumis la dicétone (XIV) à l'oxydation par l'hypoiodite de sodium (37) ; si notre hypothèse était exacte, nous aurions dû obtenir un cétoacide $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}_3$. L'oxydation est très lente et semble empêchée par la très faible solubilité du composé dans les solvants. L'action prolongée à 45° de l'hypoiodite sur la dicétone (XIV), conduit, avec un rendement, de 60-70 % à des produits acides que l'on méthyle par le diazométhane. La chromatographie des esters ainsi obtenus permet d'isoler deux composés : un ester $\text{F. } 76^\circ$, $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_4 \pm \text{CH}_2$ possédant deux méthoxyles, et un autre ester, $\text{F. } 76^\circ$, $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_5 \pm \text{CH}_2$ possédant également deux méthoxyles. L'action de l'hypoiodite dans les conditions énergiques employées n'a donc pas conduit au cétoacide $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}_3$ attendu, mais à des composés plus oxygénés ; ceux-ci sont probablement des peroxydes car leur spectre infrarouge montre une bande à $11,3 \mu$ caractéristique. Ces composés, et notamment l'ester $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}_4$, présentent des analogies avec le composé trop oxygéné $\text{F. } 76^\circ$ formé lors de l'ozonisation du diène (XVI).

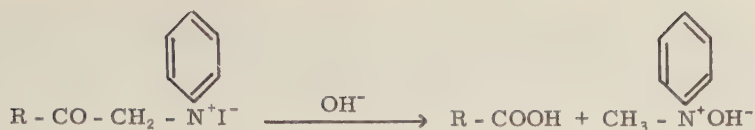
Le fait d'avoir obtenu des produits acides indique que la dicétone est vraisemblablement une méthylcétone, mais les résultats anormaux de cette réaction ne nous permettaient pas d'en avoir la certitude.

Nous avons alors soumis la dicétone (XIV) à l'oxydation par l'iode en présence de pyridine selon la méthode de King (38)* : dans ces conditions, une méthylcétone conduit à l'iodure de méthylpyridinium substitué, selon le schéma suivant :



La saponification du sel de pyridinium conduit à l'acide inférieur :

* Nous tenons à remercier encore Messieurs Jacques et Horeau de nous avoir signalé cette réaction.



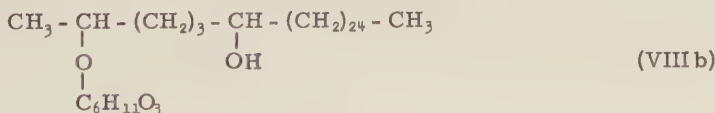
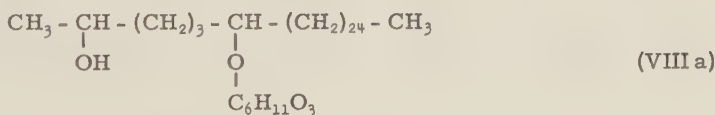
L'oxydation de la dicétone (XIV) selon la méthode de King a fourni d'une part un cétoacide, l'acide cétotriacontanoïque (XVII), $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}_3$, F. 99°-100°, que nous avons identifié par ses analyses élémentaires, son spectre infrarouge, et son poids moléculaire (calculé par acidimétrie) ; d'autre part un produit neutre, fondant à 86°, qui s'est avéré être un δ-lactol (XVIII) provenant de la cyclisation du cétoacide : ses analyses élémentaires concordent avec la formule $\text{C}_{30}\text{H}_{58}\text{O}_3$, et son spectre infrarouge montre une bande OH à 2,98 μ et une bande de δ-lactone à 5,78 μ .

Le rendement en cétoacide représente 17 % du rendement théorique, 41 % du mélange réactionnel est constitué par de la dicétone n'ayant pas réagi.

La déshydratation du lactol conduit à une émol-lactone $\text{C}_{30}\text{H}_{56}\text{O}_2$ (XIX), F. 72-74° dont le spectre I.R. ne contient plus de bande OH, mais contient une bande à 6,03 μ caractéristique de la double liaison. Une bande à 5,83 μ indique que cette émol-lactone est une δ-lactone (39).

L'obtention du cétoacide prouve que la dicétone F. 100° est une méthylcétone, et la formation du lactol montre que le deuxième groupement cétonique est en δ du premier. On peut donc en déduire que les deux groupements OH de l'aglycone B sont situés respectivement sur le carbone 2 et sur le carbone 6, ce qui confirme les résultats de l'ozonisation du diène (XVI). L'aglycone B (XI) est par conséquent le 2,6-dihydroxy-hentriacontane. Ce résultat a été confirmé par la spectrographie de masse de l'aglycone B et de son dérivé diméthoxylé.

L'ascaroside B peut donc être représenté par l'une des deux formules partielles suivantes :



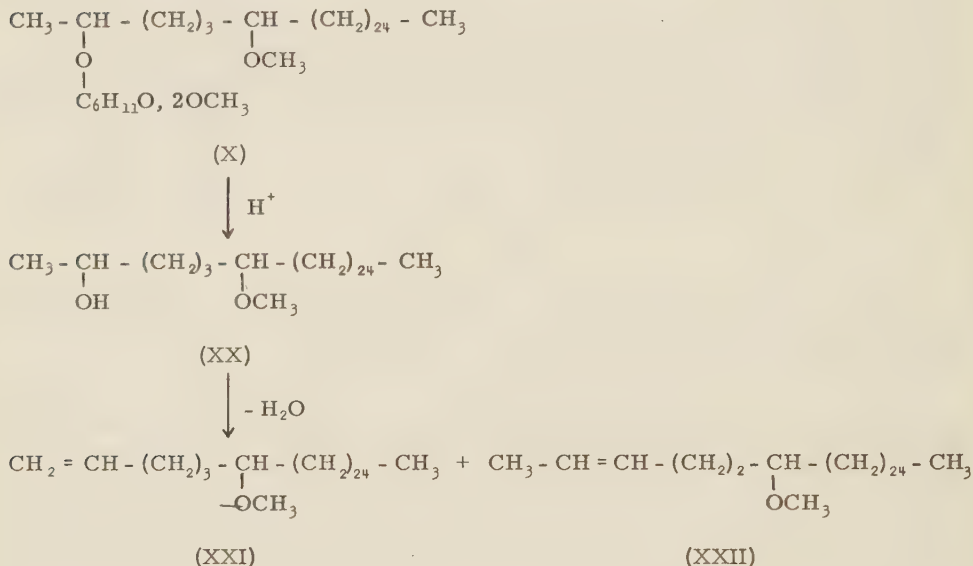
V - FORMULE PARTIELLE DE L'ASCAROSIDE B

Afin de déterminer la position de l'ascarylose dans l'ascaroside B, nous avons effectué l'hydrolyse acide du triméthyl-O-ascaroside (X). On obtient d'une part un dérivé monométhoxylé de l'aglycone B, le méthoxyhydroxyhentriacontane (XX) F. 71-72°, d'autre part un dérivé méthylé hydrosoluble de l'ascarylose, que nous n'avons pas isolé.

La déshydratation du méthoxy-hydroxy-hentriacontane en présence d'acide β-naphtalène-sulfonique conduit à un mélange de méthoxy-hentriacontènes (XXI et XXII), $\text{C}_{32}\text{H}_{64}\text{O}$ F. 55-57°.

L'ozonisation de ces composés fournit comme seuls produits volatils le formaldéhyde et l'acétaldéhyde* qui ont été identifiés par chromatographie sur papier de leurs dinitrophénylhydrazones ; la dinitrophénylhydrazone de l'acétaldéhyde a été isolée et identifiée par son point de fusion et ses analyses élémentaires.

Réactions de dégradation du triméthyl-O-ascaroside



Le produit ozonisé était donc un mélange de 6-méthoxy-hentriacontène-1,2 (XXI) et de 6-méthoxy-hentriacontène-2,3 (XXII) ; le méthoxy-hydroxy-hentriacontane F. 71° (XX), obtenu par hydrolyse du triméthyl - O - ascarioside (X) est donc le 6-méthoxy-2-hydroxy-hentriacontane. On en déduit que l'ascarylose est lié à l'aglycone B par l'hydroxyle situé sur le carbone 2.

On peut donc attribuer à l'ascarioside B la formule partielle (VIIIb).

* Si l'ascarioside B était un mélange de (VIIIa) et de (VIIIb), nous aurions dû obtenir, par ozonisation des méthoxyhentriacontènes, une certaine quantité de méthoxyaldéhyde en C₅ ou C₆. Or, nous n'avons pu déceler, dans la partie entraînable à la vapeur d'eau, que le formaldéhyde ; la formule partielle (VIIIa) est donc exclue pour l'ascarioside B.

CHAPITRE IV

ASCAROSIDE C

I - PROPRIETES ET DERIVES DE L'ASCAROSIDE C

L'ascaroside C (XXIII), troisième fraction obtenue lors de la chromatographie de l'alcool ascarylique, fond, après cristallisation dans un mélange d'éther et de chloroforme, à 93-95°, $[\alpha]_D = -77.5$ (CHCl₃). Le résultat des analyses élémentaires nous avait amené à envisager d'abord la formule brute C₃₇H₇₄O₇ (29) ; l'étude plus détaillée de la structure de l'ascaroside C nous a conduit à lui attribuer la formule brute C₄₃H₈₄O₈. Comme nous l'avons vu (p. 19), son spectre infrarouge montre une large bande OH à 3,0 μ et ne révèle pas de bande CO (fig. 3c). Le dosage de Kuhn-Roth montre la présence de quatre groupements C-CH₃.

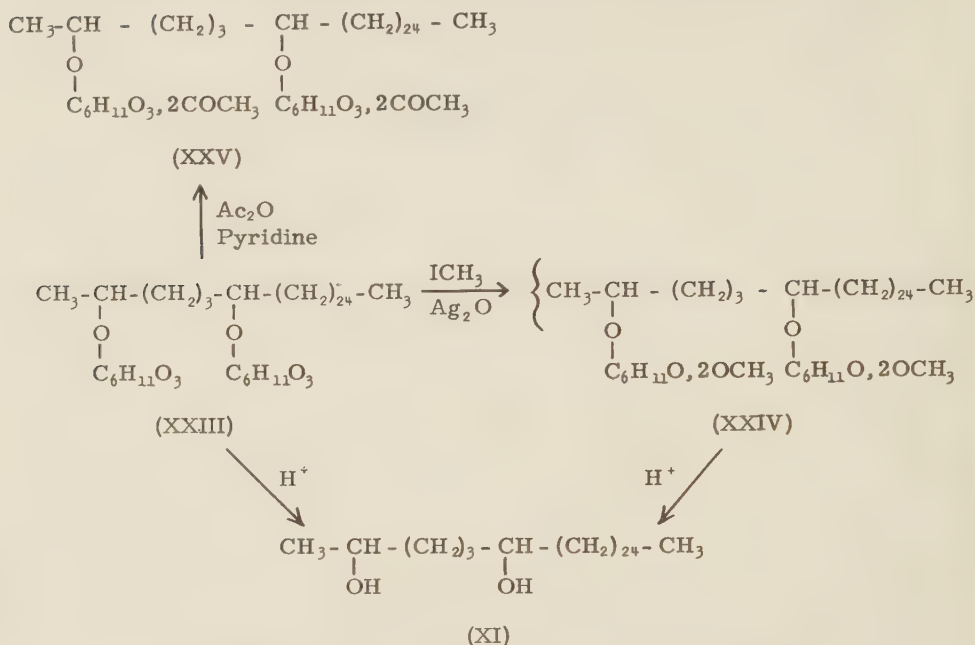
La présence de quatre hydroxyles est prouvée par l'obtention d'un tétra-éther-méthyllique (XXIV) C₄₇H₉₂O₈, F. 43°, dont le spectre infrarouge ne montre plus de bande OH, et d'un tétracétate C₅₁H₉₂O₁₂ (XXV) qui présente un double point de fusion F. 38° et F. 50°, et dont le spectre I.R. ne révèle plus de bande OH. L'ascaroside C est donc un tétrol.

II - AGLYCONE C

Comme nous l'avons vu ci-dessus, (voir p. 18), l'hydrolyse acide de l'ascaroside C fournit deux molécules d'ascarylose et un aglycone (XI) qui est identique à l'aglycone B : cette identité est prouvée par les résultats des analyses élémentaires, par l'identité des spectres infrarouges des deux aglycones et par le fait que leur mélange ne donne pas d'abaissement de point de fusion.

L'aglycone C est donc le 2,6-dihydroxy-hentriacontane.

Dérivés et réactions de dégradation de l'ascaroside C



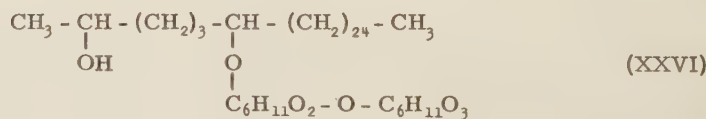
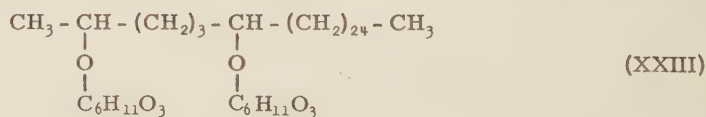
III - FORMULE PARTIELLE DE L'ASCAROSIDE C

Deux formules peuvent être envisagées pour l'ascaroside C :

- a) les deux hydroxyles du dihydroxyhentriacontane seraient liés chacun à une molécule d'ascarylose (XXIII),
- b) un seul hydroxyle du dihydroxyhentriacontane porterait un oligoside formés de deux molécules d'ascarylose (XXVI).

Nous avons résolu cette question par l'hydrolyse acide du tétraéther méthylique $\text{C}_{47}\text{H}_{92}\text{O}_8$, F. 43° (XXIV), qui a fourni un aglycone dépourvu de méthoxyle, identique à l'aglycone C, c'est-à-dire au 2,6-dihydroxy-hentriacontane ; ceci prouve que les deux hydroxyles de l'aglycone sont bloqués dans l'ascaroside C.

On peut donc attribuer à l'ascaroside C la formule partielle : (XXIII).



CHAPITRE V

ASCARYLOSE

I - PREUVES DE LA PRESENCE D'UN SUCRE DANS L'HYDROLYSAT D'ASCAROSIDE

L'hydrolyse acide de l'ascaroside B*, effectuée dans du méthanol contenant 2 % d'acide chlorhydrique 6 N (acide 0,12 N) fournit un précipité de nature lipidique ; la solution hydroalcoolique, obtenue après filtration de ce précipité, contient une substance hydrosoluble qui réduit la liqueur de Fehling et dévie la lumière polarisée.

Ceci suggérant la présence d'un sucre, nous avons effectué, directement sur la solution aqueuse, les réactions caractéristiques des sucres suivantes :

1) Réaction de Ikawa et Niemann (40) : les solutions de sucres dans l'acide sulfurique à 79 % présentent dans l'ultraviolet un faible maximum d'absorption vers 250 m μ et un autre maximum plus fort vers 315 m μ . Nous avons observé dans notre cas deux maxima, respectivement à 230 m μ , ($\epsilon = 3\,300$), et à 322 m μ , ($\epsilon = 7\,500$)

2) Réaction à l'anthrone (41) : en présence d'anthrone sulfurique, les sucres donnent des colorations qui diffèrent selon leur nature : verte pour le glucose, rouge pour le 2-désoxyribose et le digitoxose (2,6-didésoxyallose) (XXVII). L'hydrolysât d'ascaroside donne également une coloration rouge.

3) L'hydrolysât d'ascaroside est révélablé par le réactif de Partridge (21) (phthalate acide d'aniline).

Toutes ces réactions indiquent que nous nous trouvons en présence d'un ou plusieurs sucres réducteurs.

La chromatographie dans différents systèmes de solvants (tableau V) n'a montré qu'une seule tache, quelle que soit le réactif de révélation utilisé : nitrate d'argent (42), phthalate acide d'aniline (21) ou acide périodique-benzidine (22 et 23).

Ces résultats prouvent que les ascarosides fournissent un seul sucre réducteur, que nous appelons ascarylose (XXIX). Les valeurs de R_f trouvées suggèrent qu'il s'agit d'un didésoxy-sucre : elles sont en effet voisines de celles du digitoxose (XXVII) et de celles des didésoxy-sucres bactériens abé-quose et tyvelose, isolés par Westphal et coll. (6) (tableau V).

* Toutes les expériences décrites dans ce chapitre ont été effectuées à partir d'ascaroside B, car celui-ci est plus abondant que les ascarosides A et C (67 % du mélange). On obtient les mêmes résultats à partir des ascarosides A et C.

Tableau V*

	Butanol 5 éthanol 1 eau 4	Butanol 6 pyridine 4 eau 3	Acétate d'éthyle acide 3 acétique 1 eau 3	Phénol eau	Collidine eau
	R _f	R _f	R _G	R _f	R _f
Glucose	0,13	0,33	1,00	0,41	0,51
2-Désoxyribose	0,40				
Rhamnose	0,34	0,54	1,35	0,63	0,70
Digitoxose	0,57	0,71	2,10	0,90	0,79
Ascarylose	0,60	0,73	2,03	0,90	0,82
Tyvelose	0,60	0,74	2,01	0,90	0,82
Abequose	0,53	0,66	1,85	0,90	0,77



Figure 4

Chromatographie sur papier de l'ascarylose et d'autres sucres.

Développement : Butanol-pyridine-eau 6 : 4 : 3. Révélation : Phtalate acide d'aniline.
 1 - Glucose ; 2 - Rhamnose ; 3 - Hydrolysats de *S. typhi* ; 4 - Digitoxose ; 5 - Ascarylose ; 6 - Abéquose ; 7 - Hydrolysats de *S. typhi*.

II - ISOLEMENT ET DESCRIPTION DE L'ASCARYLOSE

Une première tentative d'isoler le sucre de la solution hydro-méthanolique, obtenue après hydrolyse de l'ascaroside et séparation de la partie lipidique, a fourni un sirop, constitué par le méthylglycoside qui s'est sans doute formé dans les conditions d'hydrolyse employées.

* Les chromatogrammes sont révélés par le phtalate acide d'aniline qui donne une coloration brune avec l'ascarylose, le tyvelose et l'abéquose, et une coloration jaune avec le digitoxose.

Par acétylation de ce dérivé, nous avons obtenu une substance huileuse $E_{b,0.08 \text{ mm}} = 90 - 100^\circ$ (Température du bain d'air), dont les analyses élémentaires et le dosage des groupes acétyles sont en bon accord avec la formule d'un diacétate de didésoxy-hexoside de méthyle $C_{11}H_{18}O_6$ (XXVIII).

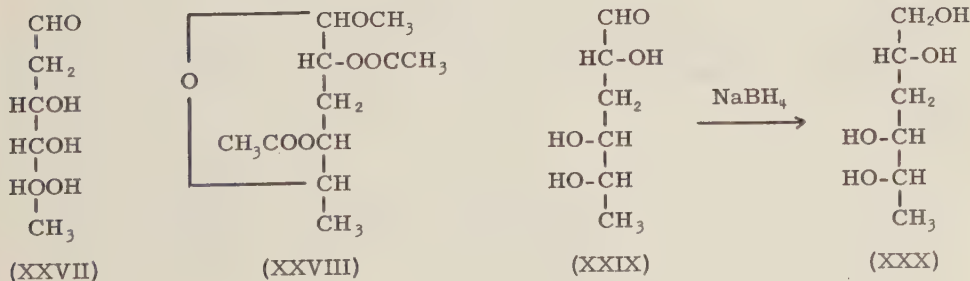
Pour isoler l'ascarylose libre, après l'hydrolyse de l'ascaroside, nous avons évaporé le méthanol de la solution hydrométhanolique contenant le méthylascaryloside, et nous avons hydrolysé celui-ci par chauffage de la solution aqueuse encore acide. Après neutralisation de l'acide et évaporation de l'eau, nous avons pu isoler l'ascarylose sous forme d'un sirop légèrement coloré, ne contenant pas de méthoxyle. Après distillation sous 0,05 mm à $126 - 135^\circ$ (T. du bain d'air), on l'obtient sous forme d'un sirop incolore $[\alpha]_D = -25^\circ (\pm 5^\circ, \text{ dans l'eau})$. Sa pureté a été vérifiée par chromatographie sur papier et par le résultat des analyses élémentaires.

Nous avons pu par la suite faire cristalliser l'ascarylose dans l'acétonitrile ; il se présente alors sous forme de fines aiguilles incolores fondant à $97 - 99^\circ$.

III - ETABLISSEMENT DE LA FORMULE BRUTE DE L'ASCARYLOSE

Les analyses élémentaires de l'ascarylose sont en bon accord avec la formule $C_6H_{12}O_4$ et le dosage de Kuhn-Roth montre la présence d'un groupement C-méthyle. Des essais de préparation d'un dérivé cristallisé, avec la phénylhydrazine, la 2,4-dinitrophénylhydrazine et l'aniline, ont échoué. Nous avons pu préparer deux dérivés cristallisés, avec des réactifs préconisés par Westphal, Feier, Lüderitz, et Fromme (43), la p,p'-nitrobiphénylsulfonylhydrazine ($NO_2-C_6H_4-C_6H_4-SO_2-NH-NH_2$) et la p-toluène-sulfonylhydrazine ($CH_3-C_6H_4-SO_2-NH-NH_2$).

La p,p'-nitrobiphénylsulfonylhydrazone de l'ascarylose fond, après trois cristallisations dans l'acétonitrile, à 152° et la p-toluène-sulfonylhydrazone fond à 124° après cristallisation dans le même solvant. Les analyses élémentaires de ces dérivés concordent respectivement avec les formules $C_{18}H_{21}O_7N_3S$ et $C_{13}H_{20}O_5N_2S$, ce qui confirme la formule $C_6H_{12}O_4$ pour l'ascarylose. Celui-ci est donc un didésoxy-hexose, ce qui est en accord avec son comportement chromatographique. (Tableau V).



IV - ETABLISSEMENT DE LA FORMULE DEVELOPPEE DE L'ASCARYLOSE

a) Nature du groupement réducteur.

Nous avons pu montrer que l'ascarylose est un aldose et non un céto-
tose, en effectuant un dosage par l'hypoiodite de sodium en milieu alcalin,
selon MacLeod et Robison (44) ; seuls les aldoses sont oxydés dans ces con-
ditions, les céto-oses ne consommant pas d'hypoiodite ; le dosage a été effec-
tué comparativement sur le rhamnose, le fructose et l'ascarylose ; celui-ci,
comme le rhamnose, consomme une molécule d'oxydant.

b) Oxydation périodique.

L'ascarylose consomme deux molécules d'acide périodique*. Parmi les
produits de la réaction, nous avons isolé l'acétaldéhyde, sous forme de sa
2,4-dinitrophénylhydrazone, qui a été identifiée par son R_f , son point de fu-
sion et ses analyses élémentaires. Ceci prouve la présence du groupement
 $\text{CH}_3\text{-CHOH-}\overset{|}{\text{COH}}$ dans l'ascarylose, qui est donc un désoxy-méthylpentose.

Nous n'avons pu déceler aucune trace de dinitrophénylhydrazine de for-
maldéhyde ; l'ascarylose ne contient donc pas de groupement $\text{-COH-CH}_2\text{OH}$.

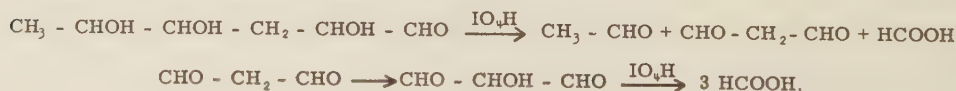
L'oxydation périodique de l'ascarylose fournit également une mole
d'acide formique : en effet, le dosage d'acidité du mélange réactionnel montre
qu'il y a eu formation d'une mole d'acide : nous avons montré qu'il s'agit
d'acide formique en utilisant une technique de Warner et Raptis (46), qui
permet de doser spécifiquement cet acide en présence d'acide acétique ou
d'autres acides. Le principe de la méthode est le suivant : seul l'acide for-
mique forme avec le chloroforme un azéotrope, dont le point d'ébullition (60°)
est très inférieur à celui de l'acide acétique (118°). La distillation du mé-
lange azéotropique permet de séparer facilement l'acide formique des autres
acides et de le doser ensuite sélectivement.

Comme nous l'avons vu ci-dessus, (p. 35), l'ascarylose est un didésoxy-
hexose ; un des groupements "désoxy" est constitué par le méthyle du grou-
pement $\text{CH}_3\text{-CHOH-}\overset{|}{\text{COH}}$. Le deuxième groupe "désoxy" est nécessairement
un groupe CH_2 ; en effet, seule la présence d'un tel groupement est compa-
tible avec les résultats exposés ci-dessus.

Les 2-désoxysucres étant des sucres naturels, il était a priori tentant
de supposer que l'ascarylose était un 2,6-didésoxy-hexose, isomère du digi-
toxose (XXVII).

On sait que les 2-désoxysucres donnent des réactions colorées spéci-
fiques. Ces réactions n'ont pas donné avec l'ascarylose de résultats con-
cluants : le réactif de Keller-Kiliani, utilisé selon von Euw et Reichstein (47),
a donné une coloration brun-rouge, tandis que les 2-désoxy-sucres donnent
en général une coloration bleue ou verte. Le réactif de Dische (48) donne
une coloration verte avec l'ascarylose, bleue avec le 2-désoxy-ribose (voir
tableau VI).

* Si on prolonge la durée de l'oxydation (48 heures au lieu de 20 heures par exemple),
l'ascarylose consomme un peu plus de deux moles d'acide périodique. Ceci est dû au
phénomène de superoxydation (45) de l'aldéhyde malonique ($\text{CHO-CH}_2\text{-CHO}$) formé (fig. 4) ;
le groupe CH_2 , activé par le voisinage des deux carbonyles, est vraisemblablement
oxydé lentement en donnant le composé CHO-CHOH-CHO , qui est oxydé par l'acide pé-
riodique en trois molécules d'acide formique.



Nous avons tenu à prouver sans équivoque que l'ascarylose n'est pas un 2,6-didésoxy-hexose.

Tableau VI

Réactions colorées de l'ascarylose et d'autres désoxysucres

	Réaction de Dische (48)	Réaction à l'anthrone (41)	Réaction de Keller-Kiliani (47)
2-Désoxyribose ...	bleu	rouge	bleu
Digitoxose	brun-vert	rouge	bleu-vert
Ascarylose	vert	rouge	brun-rouge
Abéquose	vert	rouge	brun-rouge

Dans ce but, nous avons étudié les produits de l'oxydation periodique de l'hexitol correspondant.

c) Ascarylitol.

La réduction de l'ascarylose (XXIX) par le borohydrure de sodium conduit en effet à un alcool, que nous avons appelé l'ascarylitol (XXX).

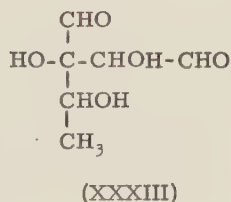
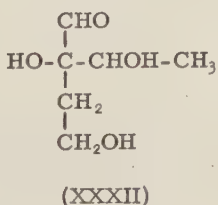
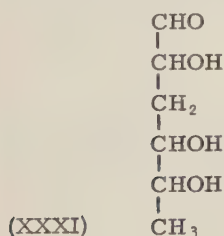
L'ascarylitol, $C_6H_{14}O_4$, cristallise dans l'acétone en belles aiguilles incolores fondant à $114-115^\circ$ [α]_D = $+ 33^\circ$ (dans l'eau, c = 0,48), R_f = 0,47 (Butanol-éthanol-eau 5 : 1 : 4). Son spectre infrarouge est représenté sur la figure 5, p. 46.

Nous avons alors soumis l'ascarylitol à l'oxydation periodique selon Fleury et Lange (28) ; parmi les produits volatils formés, nous avons isolé, en plus de l'acétaldéhyde, le formaldéhyde que nous avons caractérisé par sa 2,4-dinitrophénylhydrazone. Le dosage colorimétrique en présence d'acide chromotropique (49) montre qu'il y a eu formation d'une seule mole de formaldéhyde par mole d'ascarylitol. Rappelons que l'ascarylose, dans les mêmes conditions, fournit, en plus de l'acétaldéhyde, une molécule d'acide formique, mais pas de formaldéhyde.

Ces résultats prouvent la présence d'un groupement $-\overset{|}{\text{COH}}-\text{CH}_2\text{OH}$ dans l'ascarylitol, et par conséquent, d'un groupement $-\overset{|}{\text{COH}}-\text{CHO}$ dans l'ascarylose (XXIX). Il en résulte que celui-ci n'est pas un 2-désoxy-hexose.

d) Formule développée de l'ascarylose.

Etant donné la présence du groupement $\text{CH}_3-\text{CHOH}-\overset{|}{\text{COH}}$, l'ascarylose n'est pas non plus un 4-désoxy-hexose. Deux formules correspondant à un 3-désoxy-hexose sont compatibles avec les résultats décrits jusqu'ici : la formule "linéaire" (XXXI) et la formule "ramifiée" (XXXII). Cette formule avait été envisagée primitivement par Westphal, Lüderitz, Fromme et Joseph (6), par analogie avec celle du streptose (XXXIII), pour les sucres bactériens tyvelose et abéquose.



Nous avons pu prouver que l'ascarylose a la formule "linéaire" (XXXI) par deux méthodes différentes, l'une consistant à dégrader la lactone ascarylonique (XXXIV), l'autre à dégrader l'ascarylitol (XXX). Les deux séries de réactions sont schématisées respectivement par les formules (XXXIV) à (XXXVI) et (XXXVII) à (XL).

Dégradation de la lactone ascarylonique.

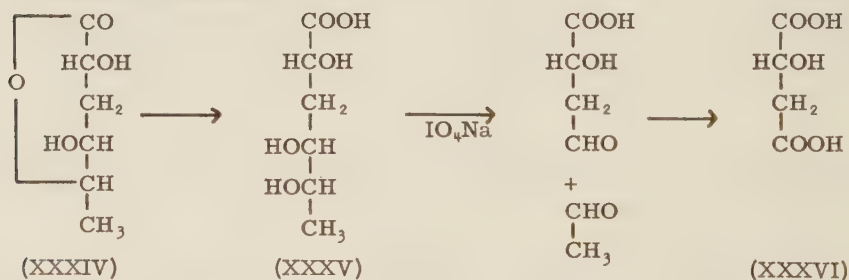
L'oxydation de l'ascarylose par l'oxyde d'argent conduit à la lactone ascarylonique (XXXIV), qui se présente sous forme d'un sirop incolore distillant à 80-100° (T. du bain d'air) sous 0,05 mm Hg ; son spectre I.R. montre une bande à 5,8 μ , due au groupement lactonique.

L'oxydation de cette lactone par le métaperiodate de sodium fournit l'acétaldéhyde*. La partie non volatile du mélange réactionnel est constituée par un mélange complexe, que l'on extrait par le chloroforme. La chromatographie sur papier selon Löffler et Reichl (34) de l'extrait chloroformique montre la présence de quatre acides, dont l'un a le même R_f que l'acide malique (XXXVI) ; une chromatographie sur papier bidimensionnelle, effectuée sur le même échantillon par J. Carles (Faculté de Toulouse) (50), a permis d'identifier, outre l'acide malique, l'acide lactique, qui pourrait provenir de la décarboxylation de l'acide malique.

La présence de ces deux acides n'est explicable que si l'ascarylose a la formule linéaire (XXXI). Ceci ressort de l'examen des formules (XXXIV) à (XXXVI) et (XXXIV bis) à (XXXVI bis). En effet, si l'ascarylose était "ramifié", l'oxydation périodique de la lactone ascarylonique (XXXIV bis) aurait conduit au cétoacide (XXXVI bis). Celui-ci, dans les conditions de l'expérience, ne peut fournir ni l'acide malique, ni l'acide lactique.

Oxydation de la lactone ascarylonique par IO_4Na

a) Formule linéaire.



b) Formule ramifiée.



* Il faut remarquer que la lactone (XXXIV), ne possédant pas de groupement α -glycol, n'est pas oxydable par le periodate. C'est donc en réalité l'acide ascarylonique (XXXV) qui a été oxydé. On peut supposer que l'équilibre lactone-acide est déplacé en faveur de l'acide au fur et à mesure de sa disparition au cours de l'oxydation.

La faible quantité des acides malique et lactique formés ne nous ayant pas permis de les identifier autrement que par leur R_f , nous avons cherché une preuve plus tangible en faveur de la formule linéaire (XXXI).

Dans ce but, nous avons procédé à une oxydation périodique partielle de l'ascarylitol ; nous avons bloqué la fonction alcool primaire par action du chlorure de triphénylméthane (chlorure de trityle) ; nous avons ensuite effectué la série de réactions schématisées par les formules (XXXVII) à (XL), dans le cas de la formule linéaire, et (XXXVII bis) à (XL bis) dans le cas de la formule ramifiée. Tandis que le composé (XL) doit être optiquement actif, le composé (XL bis) obtenu après réduction d'une cétone, ne doit pas présenter de pouvoir rotatoire. Il sera ainsi possible de déduire la formule de l'ascarylose.

Dégradation de l'ascarylitol.

L'action d'une molécule de chlorure de trityle sur l'ascarylitol (XXX) conduit au 1-tritylascarylitol (XXXVII), $C_{25}H_{28}O_4$, qui cristallise en fines aiguilles F. 144-146°. En présence d'un excès de réactif, l'ascarylitol n'a pas donné de dérivé ditritylé, ce qui est un argument en faveur de la formule linéaire (XXXI) ; en effet, si l'ascarylitol avait la formule ramifiée (XXX bis), il serait peu probable qu'un seul des deux alcools primaires soit tritylé.

L'oxydation du 1-tritylascarylitol (XXXVII) par une mole de IO_4Na , suivie d'une réduction par le borohydrure de sodium, conduit à un produit (XXXIX) amorphe, sur lequel nous avons fait réagir une mole de chlorure de trityle. Nous avons ainsi obtenu le D-2-hydroxy 1,4-ditrityloxybutane (XL), $C_{42}H_{38}O_3$, cristallisé en fines aiguilles incolores fondant à 178-180° [α]_D = - 4° (dans le benzène).

La structure de ce composé a été prouvée par la synthèse du L-2-hydroxy 1,4-ditrityloxybutane (XLIII) : la réduction de l'acide L-malique (XLI) au moyen de l'hydrure de lithium et d'aluminium conduit au L-1,2,4-trihydroxybutane (XLII) ; c'est un sirop, distillant à 80-120° (T. du bain d'air) sous 0,05 mm Hg, [α]_D = - 22° (éthanol, c = 1,0).

La tritylation du L-1,2,4-trihydroxybutane (XLII) fournit le L-2-hydroxy 1,4-ditrityloxybutane, $C_{42}H_{38}O_3$ (XLIII), qui cristallise en fines aiguilles incolores F. 176-178° [α]_D = + 4° (dans le benzène).

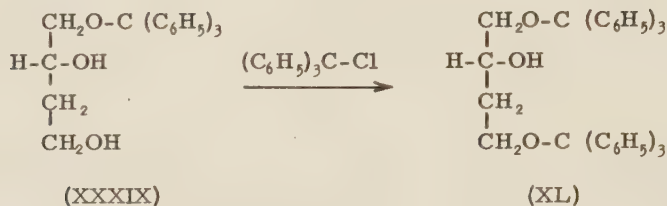
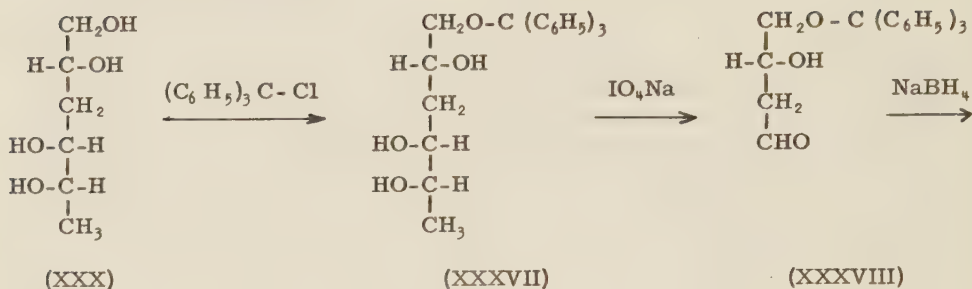
La comparaison de ce dérivé synthétique avec le dérivé ditritylé (XL) provenant de l'ascarylitol montre que ces deux composés sont des antipodes optiques ; leur mélange ne présente pas d'abaissement de point de fusion, et leurs spectres infrarouges (dans KBr ou en solution dans CCl_4) sont identiques.

L'obtention du 2-hydroxy 1,4-ditrityloxybutane (XL), optiquement actif, à partir de l'ascarylitol, prouve, ainsi que nous l'avons vu ci-dessus, que l'ascarylose a la formule linéaire (XXXI). Dans l'autre cas, on aurait en effet obtenu le dérivé racémique.

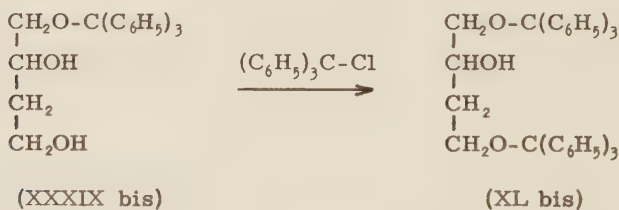
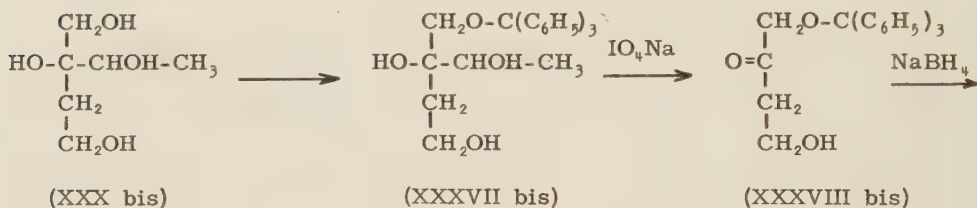
Le fait que le dérivé (XL) appartienne à la série D montre en outre que le centre assymétrique correspondant de l'ascarylose, c'est-à-dire le carbone 2, a la configuration D.

Dégradation de l'ascarylitol

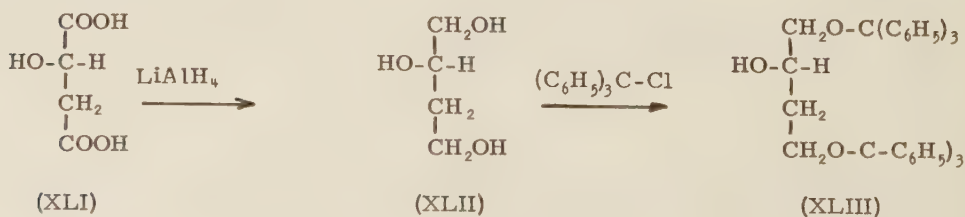
a) formule linéaire.



b) Formule ramifiée.



Synthèse du L-2-hydroxy 1,4-ditrityl-oxy-butane.



CHAPITRE VI

AUTRES 3, 6-DIDÉSOXY-HEXOSES NATURELS

Au moment où nous avons isolé l'ascarylose, Westphal et ses collaborateurs avaient déjà décrit deux didésoxysucres $C_6H_{12}O_4$, qu'ils avaient extraits d'endotoxines de bactéries gram-négatives :

L'abéquose, isolé à partir du lipopolysacccharide de l'endotoxine de *Salmonella abortus equi* (Westphal, Lüderitz, Fromme et Joseph (6)).

Le tyvelose, isolé du lipopolysaccharide de l'endotoxine de *Salmonella typhi* (Pon et Staub (4), Westphal, Lüderitz, Fromme et Joseph (6)).

Deux autres didésoxy-hexoses ont été isolés depuis :

Le paratose, isolé de l'endotoxine de *Salmonella paratyphi* (Davies, Staub, Fromme, Lüderitz et Westphal (7)).

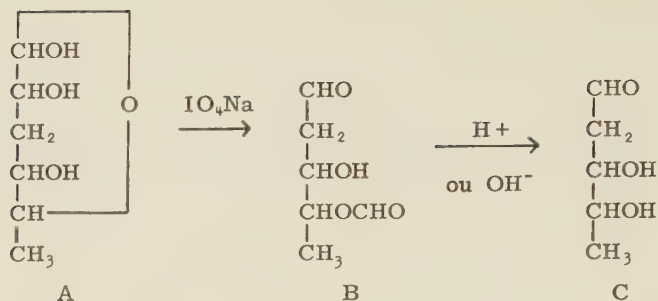
Le colitose, à partir de l'endotoxine de *Escherichia coli 101* (Lüderitz, Staub, Stirm et Westphal (8)).

Westphal, Lüderitz et leurs collaborateurs ont montré que ces quatre nouveaux sucres naturels sont des 3,6-didésoxy-aldo-hexoses de la façon suivante (6,54) : leur formule brute, $C_6H_{12}O_4$, a été déduite des analyses élémentaires de leurs dérivés cristallisés (p,p'-nitrobiphénylsulfonylhydrazones et p-toluène sulfonylhydrazones). Les quatre sucres contiennent un $C-CH_3$, mis en évidence par le dosage de Kuhn-Roth et trois groupements alcool acétylables.

Un dosage selon Willstätter-Schudel a montré la présence d'un groupement réducteur pseudo-aldéhydrique.

L'oxydation de chacun de ces sucres par une seule mole de periodate de sodium fournit quantitativement un produit de dégradation (B) qui a pu être isolé. Le composé (B) contient un groupement O-formyl titrable et donne une réaction de Webb et Lévy (52) positive*. Il s'agit donc d'un ester formique de 2,5-didésoxypentose (C).

* La réaction de Webb et Lévy (52) est une réaction colorée caractéristique des 2-désoxysucres contenant une chaîne d'au moins cinq atomes de carbone ; elle consiste à chauffer le sucre en présence d'acide trichloracétique et de p-nitro-phénylhydrazine ; on observe alors la formation d'une intense coloration violette. Fromme, Lüderitz, Stierlin et Westphal (53), ont montré que la réaction de Webb et Lévy pouvait être utilisée de façon générale pour la détermination des 3-désoxy- et des 3,6-didésoxy-aldo-hexoses : l'oxydation périodique de ces sucres fournit respectivement des 4-0-formyl 2-désoxy- et des 4-0-formyl 2,5-didésoxy-aldopentoses, qui peuvent être déterminés qualitativement et quantitativement par la réaction de Webb et Lévy. Nous avons utilisé cette méthode avec l'ascarylose dont le produit d'oxydation périodique donne effectivement une réaction de Webb et Lévy fortement positive.



L'abéquose, le tyvelose, le colitose et le paratose sont donc des 3,6-didésoxyhexoses (A), isomères de l'ascarylose (54).

L'ascarylose, que nous avons isolé des ascaris, a été également découvert récemment par MacLennan et Davies (55) dans une bactérie gram-négative, Pasteurella pseudotuberculosis. Il est jusqu'à présent le seul 3,6-didésoxyhexose qui ait été trouvé ailleurs que dans des bactéries.

CHAPITRE VII

SYNTHÈSE DE TROIS 3, 6-DIDÉSOXY-HEXOSES

Afin d'élucider complètement la structure et la stéréochimie de l'ascarylose et de ses isomères, abéquose, tyvelose, colitose et paratose, nous avons entrepris leur synthèse, en collaboration avec Westphal et Stirm.

Huit 3,6-didésoxyhexoses sont théoriquement possibles, formant quatre paires d'antipodes optiques (voir tableau VII). La synthèse de quatre isomères (un membre de chaque paire) suffisait donc pour identifier les sucres naturels. Nous avons synthétisé les 3,6-didésoxy D-arabino- (XLIX), D-ribo- (XLVI), et L-lyxo- (LI) hexoses (56, 57). Westphal et Stirm (56, 58) ont synthétisé le 3,6-didésoxy-D-xylo-hexose (XLVIII).

Pour réaliser ces synthèses, nous pouvions utiliser, comme produit de départ soit un 3-, soit un 6-désoxy-hexose.

Trois 3-désoxyhexoses étaient déjà décrits dans la littérature : le 3-désoxy D-glucose, (59), le 3-désoxy D-mannose (60) et le 3-désoxy D-galactose (61).

Tableau VII*

$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $	$ \begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{HC}-\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{HO}-\text{CH} \\ \\ \text{CH}_3 \end{array} $
tyvelose	ascarylose	paratose		abéquose	colitose		
3,6-didésoxy- <i>arabino</i>	hexose	3,6-didésoxy- <i>ribo</i>	hexose	3,6-didésoxy- <i>xylo</i>	hexose	3,6-didésoxy- <i>lyxo</i>	hexose
D	L	D	L	D	L	D	L
(XLIV)	(XLV=XXIX)	(XLVI)	(XLVII)	(XLVIII)	(XLIX)	(L)	(LI)

* Rappelons la règle 6 de la nomenclature officielle des sucres : elle stipule que la configuration des substances ayant trois groupements -CHOH doit être désignée par les préfixes *arabino*-, *ribo*-*xylo*- et *lyxo*-, chacune pouvant être D ou L (voir tableau VIII). Rappelons aussi que le terme hexose est réservé aux aldohexoses, le terme hexulose devant désigner les cétohexoses.

Il suffisait de réduire le groupement alcool primaire de ces trois sucres, pour obtenir les 3,6-didésoxyhexoses correspondants. Une des méthodes de réduction d'un alcool primaire en méthyle consiste à faire réagir sur l'alcool une molécule de chlorure de p-toluène sulfonyl (chlorure de tosyle) et à réduire le dérivé tosylé ainsi obtenu par l'hydruure de lithium et d'aluminium (Schmid et Karrer (62)).

C'est ainsi que nous avons préparé le 3,6-didésoxy-D-*arabino*-hexose (XLIV) et le 3,6-didésoxy D-*ribo*-hexose (XLVI), respectivement à partir du 3-désoxy D-mannose et du 3-désoxy D-glucose, qui nous ont été aimablement fournis par les Drs Pratt et Richtmyer (Bethesda).

Une variante de cette méthode consiste à transformer le dérivé tosylé en iodure (63), et à réduire celui-ci par l'hydrogène en présence de Ni Raney. C'est ainsi que Westphal et Stirm (58) ont synthétisé le 3,6-didésoxy D-*xylo*-hexose (XLVIII), à partir du 3-désoxy D-galactose.

Aucun 3-désoxy-hexose de configuration lyxo n'étant facilement accessible, nous avons synthétisé le 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose (LI), à partir du L-rhamnose. Au cours du travail, nous avons pris connaissance d'un mémoire de Charalambous et Percival (64) qui avaient obtenu par la même méthode le 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose, caractérisé par son R_f et son pouvoir rotatoire.

Critères permettant l'identification des 3,6-didésoxy-hexoses.

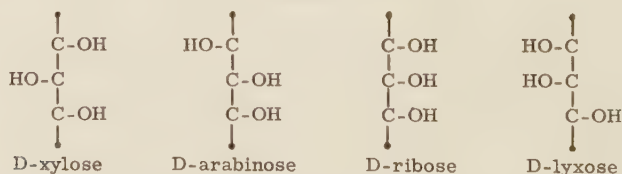
Parmi les 3,6-didésoxy-hexoses, seuls le tyvelose et l'ascarylose (3,6-didésoxy D- et L-*arabino*-hexoses (XLIV et XLV), sont cristallisés ; les autres ont été jusqu'à présent obtenus sous forme de sirops. On peut en préparer des p-toluène- et des p,p'-nitrobiphényl-sulfonylhydrazones cristallisées (43) mais ces dérivés, fondant tous entre 140° et 150°, sont difficilement utilisables pour l'identification.

Les 3,6-didésoxy-hexitols, par contre, obtenus par réduction au borohydrure de sodium des hexoses correspondants, sont cristallisés et ont des points de fusion bien déterminés, situés entre 65° et 115° ; en outre, leurs spectres infrarouges sont bien plus caractéristiques que ceux des hexoses correspondants.

L'identification des sucres naturels se base donc sur les critères suivants : point de fusion et R_{RH}^* du sucre libre ; point de fusion, pouvoir rotatoire, R_{RH} et spectres infrarouges des hexitols correspondants. Dans certains cas, l'identification a été confirmée par des tests immunologiques, dont nous parlerons plus loin, (voir p. 58).

Suite de la note de la page précédente.

Tableau VIII



* R_{RH} = R_f du sucre par rapport au R_f du rhamnose.

I - SYNTHÈSE DU 3,6-DIDESOXY D-ARABINO-HEXOSE

Le 4,6-benzylidène 3-désoxy D-mannoside de méthyle (LII) mis à notre disposition par les docteurs Pratt et Richtmyer, nous a servi de produit de départ.

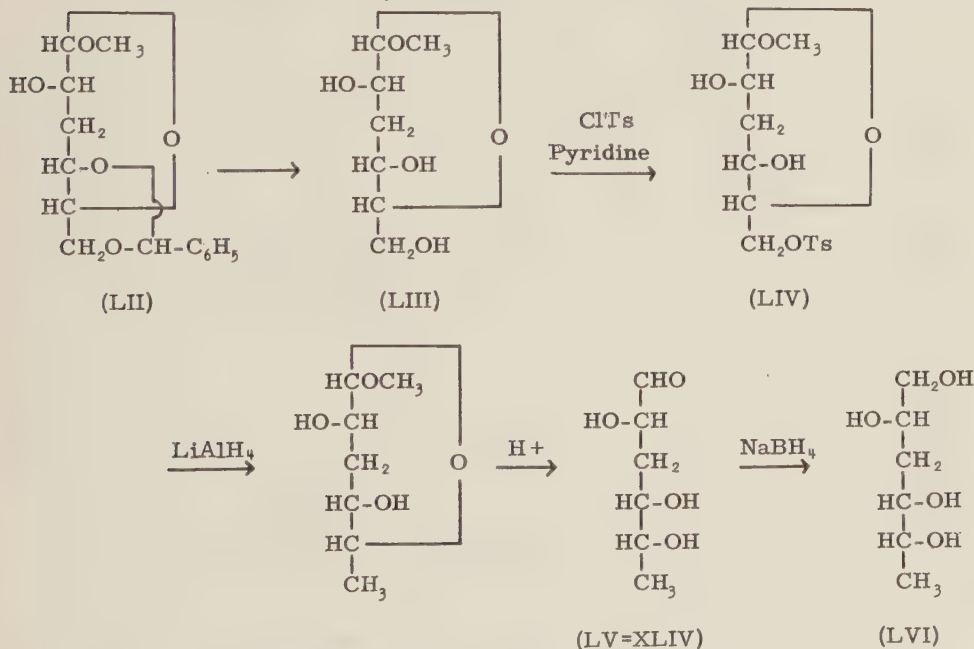
Après hydrolyse du groupement benzylidène par le chlorhydrate de p-nitrophényl-hydrazine selon Vis et Karrer (65), nous avons isolé le 3-désoxy D-mannoside de méthyle (LIII). L'action sur ce dernier d'une molécule de chlorure de tosyl conduit au 6-tosyl 3-désoxy-mannoside de méthyle (LIV), sirop que nous avons purifié par chromatographie sur silicate de magnésium-célite (2 : 1). La réduction du groupement tosyl du composé (LIV) par l'hydruure de lithium et d'aluminium, suivie d'une hydrolyse acide, (ClH 0,06 N) fournit le 3,6-didésoxy D-arabino-hexose (LV). Après purification par chromatographie sur colonne de cellulose Chro Max LKB (Stockholm), et distillation, nous avons obtenu le sucre sous forme d'aiguilles incolores, F. 97-99° $[\alpha]_D = +24^\circ \pm 2^\circ$, $R_{FH} = 1,29$.

Par réduction du sucre (LV) au moyen du borohydrure de sodium, nous avons obtenu, après cristallisation dans l'acétone, le 3,6-didésoxy D-arabino-hexitol, $C_6H_{14}O_4$, (LVI) sous forme d'aiguilles incolores F. 113-115° $[\alpha]_D = -35^\circ \pm 2^\circ$.

Structure du tyvelose.

Les propriétés physiques et chimiques du tyvelose sont identiques à celles du 3,6-didésoxy D-arabino-hexose synthétique (LV = XLIV) (voir tableau IX) ; ce dernier ne donne pas de dépression de point de fusion de mélange avec le tyvelose naturel.

SYNTHÈSE DU 3,6-DIDESOXY D-ARABINO-HEXOSE



De même le tyvelitol (tableau IX), obtenu par réduction du tyvelose, a les mêmes propriétés physiques et chimiques que le 3,6-didésoxy D-arabino-hexitol (LVI) ; les spectres infrarouges des deux hexitols sont iden-

tiques. Il n'y a pas d'abaissement du point de fusion de mélange de ces deux composés.

Structure de l'ascarylose (XLV).

L'ascarylose est l'antipode optique du tyvelose, ce que laissent prévoir les rotations optiques de ces sucres. En effet, l'ascarylose et le tyvelose ont le même R_{RH} et leurs pouvoirs rotatoires sont les mêmes en valeur absolue, mais sont de signe opposé ; l'ascarylitol et le tyvelitol ont le même point de fusion, le même R_{RH} et des rotations égales mais de signe contraire (voir tableau IX). Les spectres I.R. de l'ascarylitol et du tyvelitol synthétique (3,6-didésoxy D-*arabino*-hexitol) (LVI) sont identiques (fig. 5). L'ascarylose est donc le 3,6-didésoxy L-*arabino*-hexose (XLV = XXIX)*.

Tableau IX

Propriétés physiques de l'ascarylose, du tyvelose, du 3,6-didésoxy D-*arabino*-hexose et des hexitols correspondants

Sucre libre	Ascarylose		Tyvelose		3,6-didésoxy D- <i>arabino</i> -hexose
F.....	97-99°	CHO	97-99°	CHO	96-98°
$[\alpha]_D$	-25°	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	+ 25°	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	+ 23°
R_{RH}	1,29	CH ₃	1,29	CH ₃	1,29
Hexitol			Tyvelitol		3,6-didésoxy D- <i>arabino</i> -hexitol
F	114-115°	CH ₂ OH	112°	CH ₂ OH	113-115°
$[\alpha]_D$	+ 35°	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	-40°	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	- 35°
R_{RH}	1,07	CH ₃	1,06	CH ₃	1,07

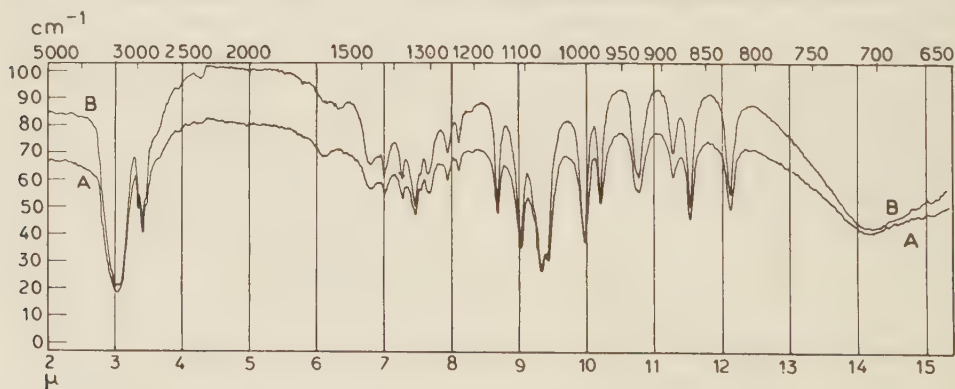


Figure 5 - Spectres d'absorption infrarouge, mesuré dans KBr, avec un Perkin Elmer, modèle 21 : A : ascarylitol ; B : 3,6-didésoxy D-*arabino*-hexitol.

* Etant donné les conditions d'extraction énergiques des ascaris (potasse à 10 %) l'ascarylose aurait pu être un produit artificiel provenant de l'épimérisation des isomères décrits ci-dessus ; nous avons vérifié qu'il n'en est pas ainsi : en effet, nous avons obtenu l'ascarylose après une hydrolyse acide douce effectuée directement sur un extrait acétonique brut d'ascaris, avant tout traitement par la potasse, si diluée soit-elle. Dans ces conditions, il ne pouvait y avoir d'altération du sucre naturel.

2 - SYNTHÈSE DU 3,6-DIDESOXY D-RIBO-HEXOSE (LXVI)

Le produit de départ utilisé est le 3-désoxy D-glucose (LVII) que nous devons à l'obligeance des Drs Pratt et Richtmyer. L'action du méthanol chlorhydrique sur ce composé fournit le 3-désoxy D-glucoside de méthyle C₇H₁₄O₅ (LVIII), sur lequel on fait réagir une molécule de chlorure de tosylé ; le 6-tosyl 3-désoxy D-glucoside de méthyle ainsi obtenu (LIX) est transformé en 3,6-didésoxy D-ribo-hexoside de méthyle (LX) par action de l'hydrure de lithium et d'aluminium ; l'hydrolyse acide du composé (LX) conduit au 3,6-didésoxy D-ribo-hexose (LXI = XLVI). Celui-ci, purifié par chromatographie sur poudre de cellulose et distillation, est un sirop incolore $[\alpha]_D = +10^\circ \pm 2^\circ$, $R_{MH} = 1,25$.

La réduction du sucre (LXI = XLVI) par l'hydrure de sodium et de bore permet d'obtenir, après chromatographie sur cellulose et cristallisation dans l'acétone, le 3,6-didésoxy D-ribo-hexitol (LXII) C₆H₁₄O₄, sous forme de cristaux incolores F. 67-68°, $R_{MH} = 1,14$ $[\alpha]_D = -17^\circ \pm 1^\circ$.

Structure du paratose.

Les propriétés physiques et chimiques du paratose sont identiques à celles du 3,6-didésoxy D-ribo-hexose synthétique (LXI = XLVI) (voir tableau X). De même, le paratitol (obtenu par réduction du paratose) a les mêmes propriétés physiques et chimiques que le 3,6-didésoxy D-ribo-hexitol (LXII). Les spectres I.R. des hexitols naturels et synthétiques sont identiques (fig. 6) et on n'observe pas d'abaissement du point de fusion de mélange des deux composés.

SYNTHÈSE DU 3,6-DIDESOXY D-RIBO-HEXOSE

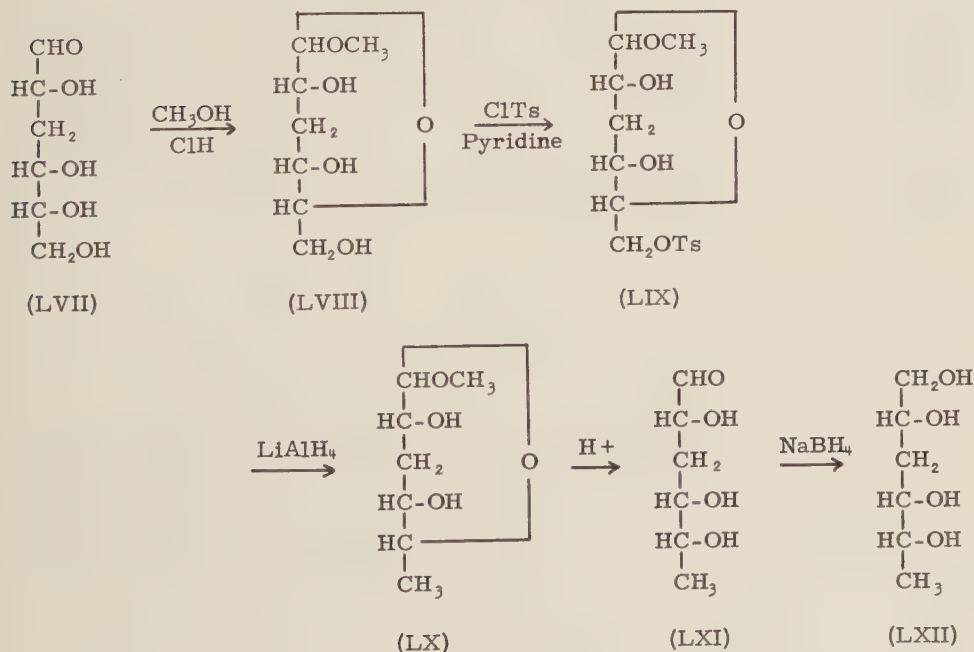


Tableau X

Propriétés physiques du paratose et du 3,6-didésoxy D-ribo-hexose

<u>Sucre libre</u>	<u>Paratose</u>	<u>3,6-didésoxy D-ribo-hexose</u>
$[\alpha]_D$	+ 8°	+ 10°
R_{RH}	1,27	1,27
	$\begin{array}{c} \text{CHO} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	
<u>Hexitol</u>	<u>Paratitol</u>	<u>3,6-didésoxy D-ribo-hexitol</u>
F	66-68°	66-68°
$[\alpha]_D$	- 18°	- 17°
R_{RH}	1,14	1,14
	$\begin{array}{c} \text{CH}_2\text{OH} \\ \\ \text{CH}_2 \\ \\ \text{CH}_3 \end{array}$	

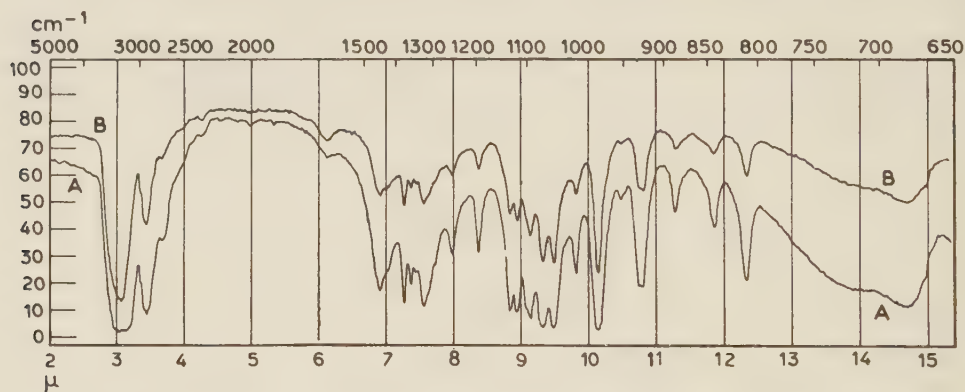


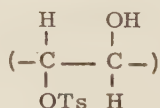
Figure 6 - Spectres d'absorption infrarouge mesurés dans KBr, avec un Perkin Elmer modèle 21 : A : paratitol ; B : 3,6-didésoxy D-ribo-hexitol.

III - SYNTHÈSE DU 3,6-DIDESOXY L- LYXO-HEXOSE (LXIX = LI)

Nous avons utilisé comme produit de départ pour cette synthèse le L-rhamnose (LXIII).

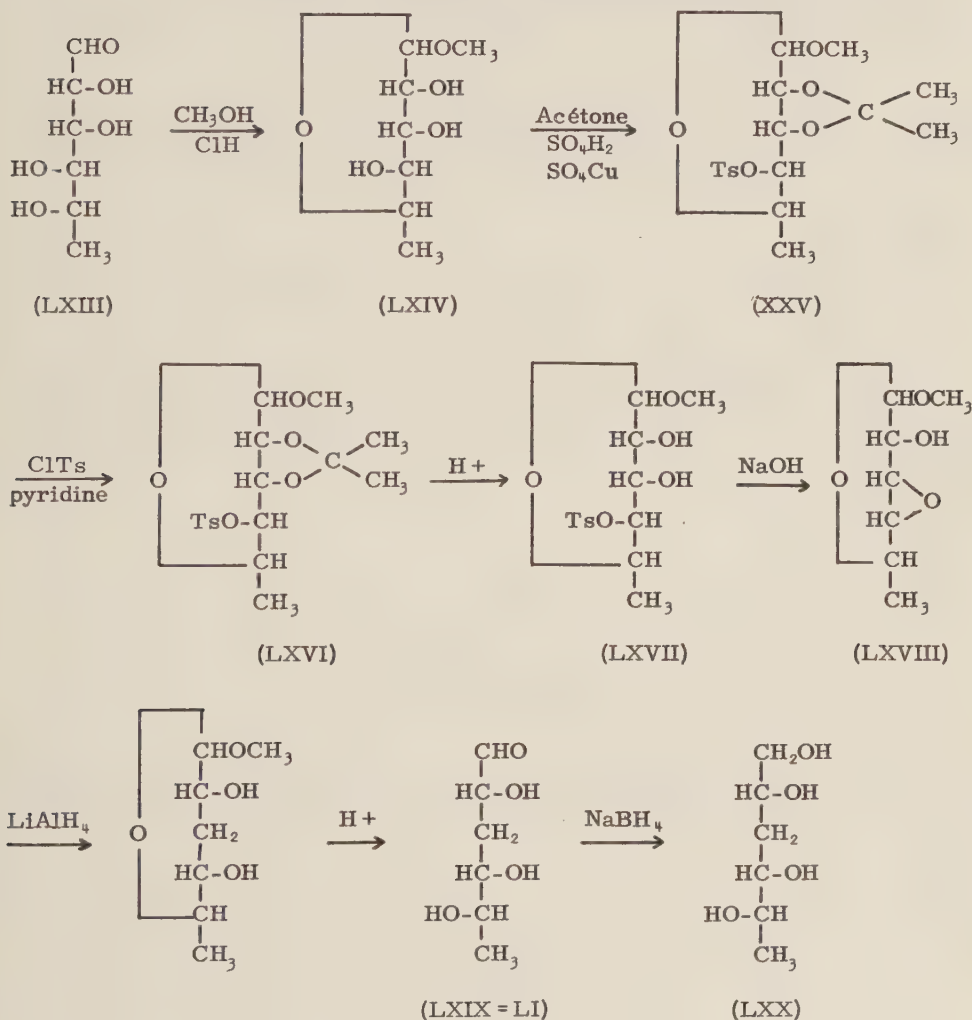
Une des méthodes de préparation des désoxysucres consiste à réduire un groupement "anhydro" $-\text{CH}-\text{CH}-$ en CH_2-CHOH (méthode de Prins) (66).

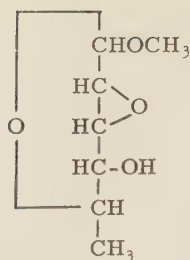
Il s'agissait de préparer dans notre cas soit le 2,3- soit le 3,4-anhydro-rhamnose. On prépare en général les anhydro-sucres par action de la soude sur un dérivé tosylé ayant un -OH en position trans,



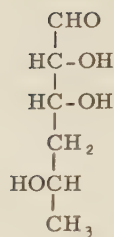
par conséquent, il fallait tosyler le rhamnose soit en 3 soit en 4. Or, le 4-tosyl L-rhamnoside de méthyle (LXVII) a déjà été préparé par Percival et Percival (67). Nous avons utilisé la même technique et effectué la série de réactions (LXIII à LXVII). L'action de la soude à chaud sur le 4-tosyl rhamnoside de méthyle (LXVII) fournit le 3,4-anhydro L-rhamnoside de méthyle (LXVIII). La réduction de ce dernier par l'hydrure de lithium et d'aluminium selon Charalambous et Percival (64), suivie d'une hydrolyse par l'acide chlorhydrique dilué fournit un didésoxysucre $C_6H_{12}O_4$ (LXIX) $R_F = 0,66$ $[\alpha]_D = -20^\circ \pm 2^\circ$; ces valeurs sont voisines de celles du sucre obtenu par Charalambous et Percival par les mêmes réactions. Le fait que ces auteurs préparent le même sucre par réduction du 2,3-anhydro 6-désoxy L-talosite de méthyle (LXXI) indique qu'il s'agit d'un 3,6-didésoxy et non d'un 4,6-didésoxy hexose.

SYNTHESE DU 3,6-DIDESOXY L-LIXO- HEXOSE ET DE L'HEXITOL CORRESPONDANT





(LXXI)



(LXXII)

Nous l'avons confirmé de la façon suivante : l'oxydation periodique selon la technique de Fleury et Lange (28) montre que ce composé consomme deux moles d'oxydant ; parmi les produits volatils formés, nous avons isolé l'acétaldéhyde sous forme de sa 2,4-dinitro-phénylhydrazone ; l'homogénéité de ce dérivé a été vérifiée par chromatographie sur papier (25).

Le rendement en acétaldéhyde (65 % de la théorie) et le fait qu'on n'ait pas pu isoler d'autre dinitrophénylhydrazone après entraînement à la vapeur d'eau, montre que le composé synthétisé est bien le 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose (LXIX = LI) et non le 4-désoxy-rhamnose (LXXII).

Propriétés du 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose (LXIX = LI) et de l'hexitol correspondant (LXX).

Le sucre (LXIX) est un sirop $[\alpha]_D = -20^\circ \pm 2^\circ$, $R_f = 0,66$, $R_{RH} = 1,29$; par action d'une molécule de p,-p'-nitro-biphénylsulfonylhydrazine, on obtient un dérivé cristallisé $C_{18}H_{21}O_7N_3S$, F. 144-145°.

Le 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexitol (LXX) obtenu par réduction du sucre libre au moyen du borohydrure de sodium, se présente, après cristallisation dans l'acétone sous forme de cristaux incolores F. 75-77° $[\alpha]_D = -10^\circ \pm 1$ (dans le méthanol), $R_{RH} = 1,12$ (voir tableau XI). Son spectre I.R. est représenté sur la figure 7, p. 51.

Tableau XI

Propriétés du 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose
et de l'hexitol correspondant

	3,6-didésoxy L- <i>lyxo</i> -hexose	3,6-didésoxy L- <i>lyxo</i> -hexitol
F	-	77°
$[\alpha]_D$	- 20° (MeOH)	- 10° (MeOH)
R_{RH}	1,29	1,12

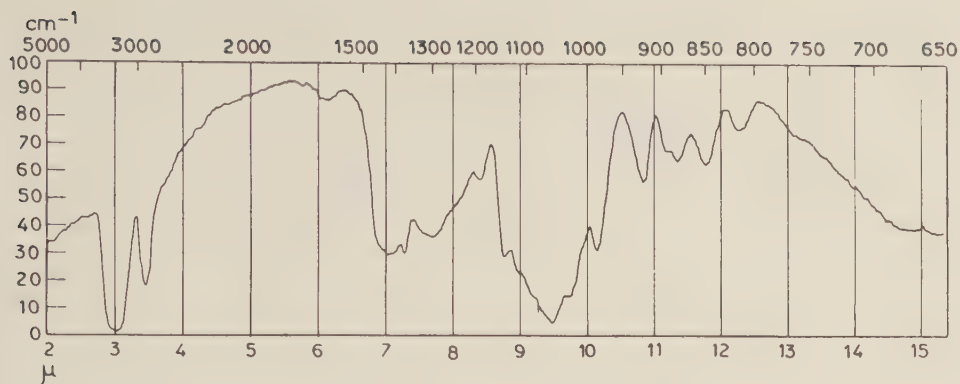


Figure 7 - Spectres d'absorption infrarouge, mesuré dans KBr, avec un Perkin Elmer modèle 21 : 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexitol.

CHAPITRE VIII

FORMULES DÉVELOPPÉES DES TROIS ASCAROSIDES

I - MODE DE LIAISON ENTRE LES AGLYCONES ET L'ASCARYLOSE DANS LES ASCAROSIDES

La facilité avec laquelle les ascarosides sont hydrolysés en milieu acide semblait indiquer que la liaison entre l'ascarylose et les aglycones A, B et C est de nature glycosidique.

Nous l'avons prouvé en montrant que le groupement réducteur de l'ascarylose n'est pas libre : en effet, les ascarosides A, B et C résistent à l'oxydation par l'hypoiodite de sodium selon MacLeod et Robison (44)*.

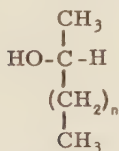
II - CONFIGURATION DES AGLYCONES

Aglycone A.

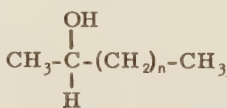
On sait que les alcools secondaires non ramifiés appartenant à la série D sont dextrogyres (Klyne) (68).

Par exemple, les pouvoirs rotatoires du 2-D-octadécanol et du 2-D-eicosanol sont respectivement de $+5,7^\circ$ et de $+4,2^\circ$, (69).

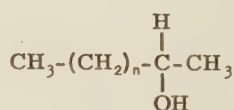
Or, le pouvoir rotatoire de l'aglycone A est de -3° . Les méthylcarbinols homologues (C_{26} à C_{30}) qui constituent l'aglycone A appartiennent donc à la série L et peuvent être représentés par l'une des formules suivantes (qui sont équivalentes)** , où n varie de 23 à 27 :



(III a)



(III b)



(III c)

* Il serait d'ailleurs étonnant que le groupe réducteur de l'ascarylose, s'il était libre, ait résisté au traitement à chaud par la potasse à 10 %, auquel ont été soumis les ascarosides.

** Si, dans la représentation de Fischer, on intervertit deux des substituants du carbone asymétrique, cela revient à inverser la configuration. Pour conserver la configuration, il faut intervertir également les deux autres substituants (70). Si, dans la formule III a), par exemple, on échange CH_3 avec OH , et $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$ avec H , on obtient la formule III b) ; si on échange CH_3 avec H et $\text{CH}_3-(\text{CH}_2)_n-$ avec OH , on obtient la formule III c). Ces trois formules sont équivalentes.

D'après les définitions de Cahn, Ingold et Prelog (70), on peut également écrire que les méthylcarbinols qui constituent l'aglycone A sont des R (-) alkanes 2-ols.

Aglycone B.

L'aglycone B et ses dérivés (diéther méthylique et diacétate) n'ont pas de pouvoir rotatoire mesurable.

On peut donc supposer soit que l'aglycone B est un composé racémique, soit que les configurations de ses deux centres asymétriques sont inverses l'une de l'autre. Dans ce cas, les rotations de chaque centre asymétrique seraient également inverses et se compenseraient mutuellement, ce qui expliquerait l'absence de pouvoir rotatoire de l'aglycone B.

Les méthoxyhentriacontènes (XXI et XXII voir p.30), qui ne possèdent plus qu'un seul centre asymétrique, n'ont pas non plus de pouvoir rotatoire mesurable, du moins à la longueur d'onde de la raie D du sodium. La mesure de la dispersion rotatoire de l'aglycone B et de ses dérivés permettrait seule de déterminer s'il s'agit effectivement de composés racémiques.

III - CONFIGURATION DE LA LIAISON GLYCOSIDIQUE DANS LES ASCAROSIDES A, B ET C

Les liaisons entre les aglycones et l'ascarylose dans les trois ascarosides sont des liaisons α -L-glycosidiques. Ceci ressort des comparaisons entre les rotations moléculaires de l'ascarylose, des aglycones, et des ascarosides.

Aglycone A.

La rotation moléculaire de l'aglycone A est de $\frac{-3^\circ \times 410}{100} = -12,3^\circ$,

celle de l'ascaroside A est de $\frac{-55^\circ \times 540}{100} = -270^\circ$,

celle de l'ascarylose est de $\frac{-25^\circ \times 148}{100} = -37^\circ$.

D'après la règle de Klyne (71), la contribution de la partie osidique à la rotation moléculaire d'un glycoside est égale à la différence des rotations moléculaires du glycoside et de l'aglycone :

$$C = M_0 \text{ glucoside} - M_0 \text{ aglycone}$$

soit dans notre cas : $C = -270^\circ - (-12,3^\circ) = -257,7^\circ$ *.

La contribution de la partie osidique étant plus lévogyre que la rotation moléculaire du sucre seul, la liaison glycosidique a par définition la configuration β -D ou α -L. L'ascarylose appartenant à la série L, l'ascaroside A est un α -L-glycoside.

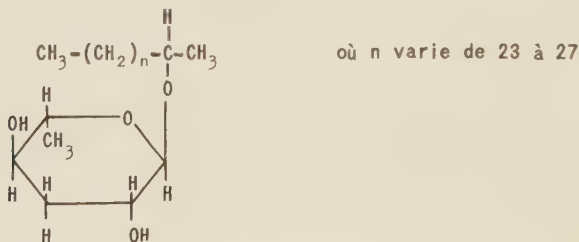
* Les pouvoirs rotatoires de l'ascarylose et des ascarosides ont été mesurés respectivement dans l'eau et dans le chloroforme. Les différences de rotation dues au changement de solvant sont négligeables par rapport aux différences dues à la liaison glycosidique.

L'aglycone B (ou C) n'ayant pas de pouvoir rotatoire, la contribution de la partie osidique est égale à la rotation moléculaire du glycoside, soit, pour l'ascaroside B : $M_D = \frac{-49^\circ \times 598}{100} = -293^\circ$, et $M_D = \frac{-77,5^\circ \times 728}{100} = -565^\circ$ pour l'ascaroside C. L'ascaroside B a donc la configuration α -L. La rotation moléculaire de l'ascaroside C étant pratiquement double de celle de l'ascaroside B ($2 \times 293 = -586^\circ$), les liaisons des deux molécules d'ascarylose dans l'ascaroside C ont également la configuration α -L.

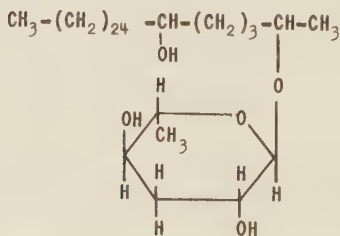
IV - FORMULES DEVELOPPEES DES ASCAROSIDES

Etant donné que la plupart des glycosides naturels (en particulier les glycosides cardiaques, qui contiennent des 2,6-didésoxyhexoses), sont sous forme pyranosidique, et qu'il en est de même pour les glycosides synthétiques de 3-désoxy-hexoses*, nous pouvons supposer, par analogie, que les ascarosides sont également sous forme pyranosidique. Les formules développées des ascarosides A, B et C sont alors les suivantes :

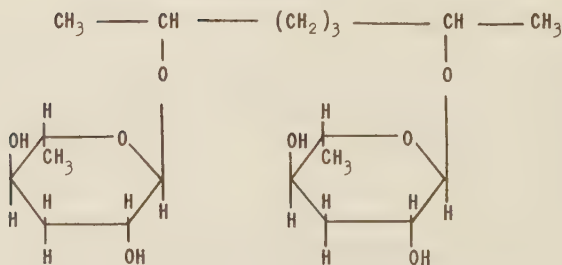
ASCAROSIDE A



ASCAROSIDE B



ASCAROSIDE C



* On n'a pas isolé jusqu'à présent des glycosides de 3-désoxyhexoses naturels.

ROLE BIOLOGIQUE DES 3,6-DIDÉSOXY-HEXOSES

La part que nous avons prise à la détermination de la structure chimique des 3,6-didésoxy-hexoses nous a permis d'apporter notre contribution à un ensemble plus vaste de travaux concernant la biochimie des endotoxines de bactéries gram-négatives. Il nous semble donc intéressant de résumer les connaissances acquises sur les propriétés biologiques et chimiques de ces endotoxines.

Nous nous référerons pour cela aux textes des conférences prononcées en 1959 par le Professeur Westphal (72) et Mlle Staub (73) devant la Société Française de Microbiologie, ainsi qu'à une publication récente de Westphal et Lüderitz (74).

A - ACTIVITE BIOLOGIQUE DES ENDOTOXINES DE BACTERIES GRAM-NEGATIVES -

Les endotoxines, qui sont responsables de la toxicité des bactéries gram-négatives, sont des substances à haut poids moléculaire, situées dans la paroi des bactéries. La première technique d'isolement et de purification de ces substances a été mise au point par Boivin (75).

L'injection intraveineuse de ces endotoxines provoque chez les animaux supérieurs et chez l'homme les mêmes réactions que l'injection de bactéries tuées par la chaleur ; on observe d'une part des réactions non spécifiques telles que l'augmentation brutale de la température, des changements dans le tableau des cellules blanches (leucopénie, leucocytose) etc., d'autre part des réactions spécifiques telles que la formation d'anticorps et l'augmentation de la résistance spécifique aux infections (immunisation).

B - COMPOSITION DES ENDOTOXINES -

Les travaux de Morgan et Partridge (76), de Goebel et coll. (77) puis de Westphal et Lüderitz (78), ont montré que les endotoxines sont des complexes glucido-lipido-protéiniques à très haut poids moléculaire (de 1 à 10 millions).

Westphal et Lüderitz ont mis au point une technique d'extraction qui leur a permis d'isoler un lipopolysaccharide dépourvu de protéine (79), qui possède la même activité que l'endotoxine elle-même, et qui est par conséquent responsable de l'activité endotoxique (80).

Le lipopolysaccharide est constitué par un composé lipidique, que Westphal appelle lipide A (80) et par un polysaccharide phosphorylé.

Il ressort des travaux de Morgan (76), Boivin, Goebel, Westphal et leurs collaborateurs (81 à 84), que l'activité endotoxique non spécifique et la spécificité antigénique sont dues à des constituants différents du complexe endotoxique.

Ces auteurs ont montré que le lipide A est responsable de l'activité non spécifique (83, 84) : son injection à des animaux provoque en effet les

mêmes réactions aiguës que l'endotoxine (fièvre, etc.) alors que le polysaccharide est inactif. Par contre, c'est le polysaccharide qui est responsable de l'activité immunologique de l'endotoxine (80, 82, 84) et de sa spécificité antigénique : en effet, les anticorps formés dans les sérums antibactériens sont spécifiques, en majorité, sinon totalement, contre le polysaccharide.

C - ACTIVITE IMMUNOLOGIQUE DES ENDOTOXINES - ROLE DU POLYSACCHARIDE -

Les immunologistes appellent "antigènes O" les polysaccharides des endotoxines de bactéries gram-négatives, et "activité antigénique O" leur activité immunologique.

L'antigène O d'une espèce bactérienne (appelée sérotype en immunologie) peut provoquer la formation de plusieurs anticorps différents, chaque anticorps étant spécifique contre un "facteur antigénique" déterminé.

Chimiquement, les divers facteurs antigéniques d'un même sérotype ne sont pas de grosses molécules distinctes, mais de courtes chaînes oligosidiques constituant des ramifications du polysaccharide (73). Les différents facteurs antigéniques d'un polysaccharide sont mis en évidence par des réactions de précipitation sérologiques dont le principe est le suivant :

Lorsqu'on injecte l'antigène O d'un sérotype donné à un animal, celui-ci produit un antisérum spécifique (sérum contenant des anticorps) ; ce sérum est capable de précipiter l'antigène de ce sérotype. En d'autres termes, les anticorps en solution dans le sérum se combinent spécifiquement avec le polysaccharide antigénique en formant un composé à plus haut poids moléculaire, qui précipite.

On dit que deux espèces donnent une réaction de précipitation croisée positive lorsque l'antigène de l'une est précipité par l'antisérum homologue de l'autre. Cela signifie qu'il existe un facteur antigénique commun aux deux espèces.

Les réactions de précipitation croisée ont une grande utilité en immunologie, car elles permettent de déterminer de proche en proche quels sont les différents facteurs antigéniques de chaque espèce (ou sérotype) et d'établir ainsi une classification sérologique des bactéries.

Chaque sérotype possède plusieurs facteurs antigéniques, qui sont désignés par des nombres symboliques ; un seul de ces facteurs est caractéristique. Tous les sérotypes qui possèdent le même facteur caractéristique sont classés dans un même groupe. La classification des Entérobactériacées (*Salmonella*, *Escherichia*, etc.) porte le nom de Kauffmann-White, (voir tableau XII).

Le groupe A est caractérisé par le facteur 2, le groupe B par le facteur 4, le groupe C par le facteur 8, le groupe D par le facteur 9, le groupe O par le facteur 35.

Les facteurs antigéniques non caractéristiques, par exemple les facteurs 1 et 12, sont communs à plusieurs groupes, mais leur présence n'est pas obligatoire, le même sérotype pouvant se manifester avec ou sans ces facteurs (73).

Les immunochimistes se sont attachés à déterminer la constitution chimique des facteurs antigéniques désignés par ces symboles. C'est ainsi que Staub et Tinelli, Kauffmann, Westphal et Lüderitz (85, 86, 87) ont analysé de nombreux polysaccharides bactériens, particulièrement parmi les *Salmonella* et les *Escherichia coli*, et qu'ils ont pu établir un rapport entre leur

constitution chimique et la classification sérologique du tableau de Kauffmann-White.

Tableau XII
Sucres constituant les antigènes O de quelques
bactéries gram-négatives

ESPECE (Sérotype)	Groupe	Antigène O (Schéma de Kauffmann-White)	SUCRES (dans l'ordre chromatographique)												
			Galactosamine	Glucosamine	Hepiotes	Galactose	Glucose	Mannose	Fucose	Rhamnose	Abéqrose	Colltose	Paratose	Tyvelose	Ascarylose
S. paratyphi A S. paratyphi A var. durazzo S. kiel	A	1, <u>2</u> , 12 2, 12 1, <u>2</u> , 12		+	+	+	+	+	+		+		+	+	
S. abortus equi S. paratyphi B S. typhi murium	B	<u>4</u> , 12 <u>4</u> , 5, 12 <u>4</u> , 5, 12		+	+	+	+	+	+		+	+			
S. muenchen S. kentucky	C ₂ C ₃	6, <u>8</u> (<u>8</u>), <u>20</u>		+	+	+	+	+	+		+	+			
S. typhi S. miami S. dublin S. haarlem	D ₁ D ₂	<u>9</u> , 12 1, <u>9</u> , 12 1, <u>9</u> , 12 (<u>9</u>), 46		+	+	+	+	+	+		+			+	
S. adelaide E.coli Arizona	0 0111 20	35		+	+	+	+	+				+	+		
S. greenside E.coli Arizona	2 055 9	50	+	+	+	+	+	+				+	+		
P. pseudotuber- culosis	V			+	+		+	+	+						+

Certains polysaccharides, en particulier ceux des Salmonella, sont très complexes et contiennent de nombreux sucres différents (parfois six ou sept) : hexoses, hexosamines, heptoses, pentoses et désoxy-hexoses ; parmi ceux-ci les 3,6-didésoxy-hexoses se sont révélés être du plus grand intérêt.

Le tableau XII résume quelques-uns de ces résultats. On peut observer que chaque groupe de Salmonella ne contient jamais qu'un seul 3,6-didésoxy-hexose : paratose pour le groupe A, abéquose pour le groupe B, tyvelose pour le groupe D, coltose pour le groupe O. Les autres sucres étant présents dans les polysaccharides de tous les sérotypes, la spécificité de groupe est donc nettement due à la présence des didésoxy-sucres, ce qui a été confirmé par les travaux de Westphal, Lüderitz, Staub et Tinelli (88, 89).

D - EMPLACEMENT ET ROLE DES DIDESOXY-SUCRES DANS LES POLYSACCHARIDES

Pon et Staub (4), Westphal, Lüderitz et coll. (6) ont montré que les 3,6-didésoxy-hexoses occupent dans le polysaccharide une position terminale en bout de chaîne : ces sucres sont en effet libérés les premiers par une hydrolyse douce du lipopolysaccharide.

Staub et Tinelli (85) ont confirmé la position terminale des didésoxy-hexoses en utilisant des réactions d'inhibition spécifique dont le principe est le suivant :

La précipitation d'un polysaccharide par l'antisérum homologue peut être plus ou moins inhibée par la présence à l'état libre du sucre terminal de la chaîne qui constitue le facteur antigénique.

Ces réactions d'inhibition sont hautement spécifiques, ce qui est facilement compréhensible si l'on se représente l'anticorps comme un moulage de l'antigène, la molécule d'anticorps possédant une cavité ayant exactement la même forme que l'extrémité de la chaîne antigénique. On conçoit alors que seul le sucre terminal de cette chaîne puisse entrer dans cette cavité et se fixer ainsi sur l'anticorps.

On conçoit également que la présence du sucre libre puisse inhiber la précipitation antigène-anticorps ; en effet, lorsque le sucre libre se fixe sur l'anticorps, il occupe la place où se fixerait l'extrémité de la chaîne antigénique ; la condensation antigène-anticorps, et par conséquent la précipitation, ne peut pas avoir lieu. C'est ainsi que la précipitation de l'antigène 9 par l'antisérum homologue est inhibée par la présence de tyvelose, mais pas par l'ascarylose, qui est son antipode optique.

Staub et Tinelli (85, 88) ont ainsi pu démontrer que l'abéquose est le sucre terminal du facteur antigénique 4 (groupe B), le tyvelose celui du facteur 9 (groupe D), le colitose celui du facteur 35 (groupe O), le paratose celui du facteur 2 (groupe A).

Il résulte de ces faits que certains antisérums bactériens sont des réactifs spécifiques qui permettent d'identifier des 3,6-didésoxysucres individuels, même si on n'en possède que de faibles quantités : par exemple, si un sucre inhibe la précipitation du système antigène-anticorps de *S. typhi* (groupe D), on peut en conclure que ce sucre est le tyvelose. Inversement, si un sucre n'inhibe pas ce système, on peut en déduire que ce n'est pas du tyvelose.

Staub et Tinelli (56) ont ainsi confirmé que le 3,6-didésoxy-D-arabino-hexose synthétique est identique au tyvelose, et que le 3,6-didésoxy-D-lyxohexose synthétique est identique à l'abéquose.

C'est également ainsi qu'ont été découverts le colitose et le paratose, dans les polysaccharides de *E. coli* (8) et *S. paratyphi* (7) ; la chromatographie sur papier de ces sucres semblait indiquer qu'il s'agissait respectivement d'abéquose et de tyvelose. S'il en était réellement ainsi, l'abéquose aurait dû inhiber la précipitation antigène-anticorps de *E. coli*, et le tyvelose aurait dû inhiber la précipitation antigène-anticorps de *S. paratyphi*. Or, la précipitation n'était inhibée ni dans un cas ni dans l'autre. On en a déduit qu'on avait affaire à deux nouveaux sucres, ce qui a été vérifié par la suite après leur isolement.

L'ensemble de ces résultats montre que les 3,6-didésoxy-hexoses, qui caractérisent immunologiquement les différents groupes de bactéries, jouent

un rôle déterminant dans la formation des anticorps - et par conséquent dans la spécificité de l'immunisation chez l'animal ou chez l'homme*.

Il faut cependant remarquer que la nature du sucre terminal de la chaîne antigénique - si elle est déterminante - n'est pas seule responsable de la spécificité de l'antigène ; ceci est illustré par le fait que les facteurs antigéniques des *E. coli* 0111 et 055 - sont distincts, bien qu'ils se terminent tous deux par du colitose ; de même les facteurs 4 (groupe B des *Salmonella*) et 8 (groupe C₂) sont différents, quoique terminés tous deux par de l'abéquose.

Il est vraisemblable que la nature et le mode de liaison du deuxième et du troisième sucre de la chaîne oligosidique interviennent dans la spécificité du facteur antigénique, particulièrement pour les polysaccharides dont la précipitation est peu inhibée par le 3,6-didésoxy-hexose seul, ce qui est le cas des polysaccharides contenant du paratose (groupe A).

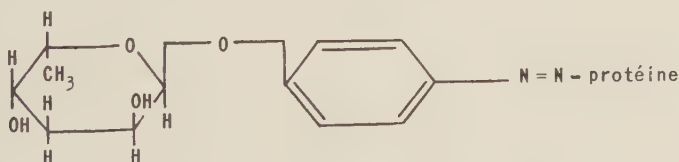
C'est pourquoi il serait intéressant d'élucider la structure complète de la chaîne oligosidique constituant le facteur antigénique. Il n'a malheureusement pas été possible jusqu'ici d'isoler un oligoside contenant un 3,6-didésoxy-hexose, car celui-ci est libéré le premier par hydrolyse partielle du polysaccharide. Certains résultats ont pu cependant être obtenus par des moyens indirects. Par exemple, en hydrolysant le polysaccharide dans des conditions très douces, il est possible de libérer seulement le 3,6-didésoxy-hexose, et de déterminer dans certains cas la nature du nouveau sucre terminal.

Staub et Tinelli (72) ont ainsi montré que les antigènes 9 et 4 ont respectivement la composition partielle suivante :

- antigène 9 : tyvelose 1-3 mannose 1-
- antigène 4 : abéquose-galactose-mannose-

E - SYNTHÈSE D'UN ANTIGÈNE ARTIFICIEL -

Lüderitz, Westphal, Staub et Le Minor (90) ont pu apporter une preuve directe du rôle joué par le colitose dans la spécificité immunologique des polysaccharides de *E. coli* et des *Salmonella* du groupe O ; ces auteurs ont en effet synthétisé un antigène artificiel à partir du colitose, en couplant une protéine au p-amino-phényl- α -colitopyranoside par la méthode de diazotation de Landsteiner.



Des chèvres et des lapins ont été immunisés avec cet antigène artificiel ; les lapins ont fabriqué des anticorps très spécifiques contre le colitose ; les chèvres, elles, fournissent un antisérum qui, non seulement réagit normalement avec l'antigène artificiel, mais aussi donne de fortes réactions de précipitation croisée avec des polysaccharides et des bactéries *E. coli* 0111, *Salmonella* 035 et Arizona 20 (voir tableau XII)

* Ce rôle est souligné par le fait suivant : les bactéries gram-négatives existent sous deux formes, la forme "smooth" pathogène et la forme "rough" non pathogène, le passage de l'une à l'autre s'effectuant par mutation. Il est intéressant de constater que les bactéries non pathogènes ont perdu le pouvoir de synthétiser les désoxy-sucres (71, 87).

C'est la première fois qu'un antigène artificiel ayant les mêmes effets immunologiques qu'un antigène de bactérie gram-négative a été synthétisé.

F - BIOSYNTHESE DES DIDESOXY-HEXOSES -

On connaît encore peu de choses sur la biogenèse des 3,6-didésoxy-hexoses. Récemment, plusieurs auteurs ont étudié la biosynthèse du colitose par *E. coli* 0111, à partir de glucose marqué par du C^{14} , soit en position 1, soit en position 2, soit en position 6 (91, 92, 93). Ils ont obtenu du colitose marqué aux mêmes positions que le glucose, ce qui montre que la transformation biochimique du glucose en colitose s'est accomplie sans scission de la chaîne carbonée.

G - CONCLUSION -

Quelle que soit la biogenèse des 3,6-didésoxy-hexoses, il est intéressant de constater que des bactéries d'espèces très voisines, comme le sont les *Salmonella*, sont capables de synthétiser, les unes la forme D, les autres la forme L d'une même substance (l'abéquose et le colitose par exemple).

Quant à l'ascarylose, il est le seul 3,6-didésoxy-hexose qui ait été trouvé jusqu'à présent dans d'autres organismes que des bactéries.

L'ensemble des résultats que nous venons de résumer a permis de faire largement progresser les connaissances, jusqu'alors assez confuses, sur la nature des antigènes O des bactéries gram-négatives. La collaboration fructueuse, qui s'est établie entre plusieurs laboratoires de disciplines différentes a ainsi permis de découvrir une nouvelle classe de sucres naturels, d'en élucider la structure, de réaliser leur synthèse et de mettre simultanément en évidence leur rôle biologique important.

PARTIE EXPÉRIMENTALE

CHAPITRE I

ISOLEMENT ET DESCRIPTION DES ASCAROSIDES

I - ISOLEMENT DE L'"ALCOOL ASCARYLIQUE"

Extraction des ascaris.

2,160 kg d'ascaris, provenant des abattoirs, sont lavés à grande eau et introduits dans un ballon, surmonté d'un réfrigérant, contenant 7,5 litres de potasse aqueuse à 10 %. On chauffe pendant 8 à 10 heures au bain-marie bouillant. Les ascaris se désagrègent peu à peu; la liqueur, devenue marron et trouble est extraite plusieurs fois à l'éther (on détruit les émulsions par l'alcool).

Les extraits étherés, lavés à l'eau jusqu'à neutralité et séchés, fournissent 9 g de cire marron.

Ces 9 g, additionnés de 200 cm³ de potasse méthanolique 2 N, sont chauffés à l'ébullition pendant 12 heures. On extrait à l'éther comme précédemment et on recueille 7,2 g d'insaponifiable, sous forme d'une cire jaunâtre.

II - SEPARATION DE L'"ALCOOL ASCARYLIQUE" EN ASCAROSIDES A, B & C

Chromatographie de l'"alcool ascarylique".

5,345 g d'insaponifiable sont chromatographiés à chaud (37°) sur 180 g d'Al₂O₃ (activité I); éluions de 500 cm³.

			mg	F*	
1.	Benzène + chloroforme	1 : 1	30		
2.	" "	1 : 1	16		
3.	Chloroforme pur		890		
4.	" "		83		
5.	" "		50		
6.	" "		33		
7.	Chloroforme + méthanol	199 : 1	93	75°-76°	
8.	" "	199 : 1	296	77°-78°	} Ascaroside A
9.	" "	199 : 1	141	77°-78°	
10.	" "	99 : 1	100	72°-76°	
11.	" "	99 : 1	221	68°-80°	
12.	" "	99 : 1	165	82, 5°-83, 5°	} Ascaroside B
13.	" "	98 : 2	883	82, 5°-84°	
14.	" "	98 : 2	421	80°-83°	
15.	" "	95 : 5	547	82, 5°-83°	
16.	" "	95 : 5	79	81°-86°	
17.	" "	95 : 5	46		
18.	" "	9 : 1	322	95°-96°	} Ascaroside C
19.	" "	9 : 1	44	95, 5°-96°	
20.	" "	8 : 2	28		
			4 488		

* F. après cristallisation dans un mélange d'éther et de chloroforme.

La réaction de Liebermann-Burchard effectuée sur les fractions 3 à 7 a donné une coloration verte. Ces fractions contiennent donc des stérols.

Les fractions 8 et 9 sont constituées par de l'ascaroside A.

Analyse d'un échantillon de la fraction 9.

$C_{34}H_{68}O_4$	Calculé	C %	75,50	H %	12,67	3 C-CH ₃ %	8,31
	Trouvé		75,73		12,62		7,42
			75,65		12,87		
			75,50		12,81		

Les fractions 12 à 15 sont constituées par de l'ascaroside B.

Analyse d'un échantillon de la fraction 12.

$C_{37}H_{74}O_5$	Calculé	C %	74,19	H %	12,45	3 C-CH ₃ %	7,51
	Trouvé		74,21		12,67		7,55
			73,99		12,68		

Les fractions 18 et 19 sont constituées par de l'ascaroside C.

Analyse d'un échantillon de la fraction 18.

$C_{43}H_{84}O_8$	Calculé	C %	70,83	H %	11,61	4 C-CH ₃ %	8,24
	Trouvé		70,75		11,68		8,50
			70,76		11,88		
			70,47		11,82		

EXTRACTION DES ASCARIS PAR L'ACETONE -

2 kg d'ascaris ont été macérés pendant 24 heures dans 5 litres d'un mélange d'alcool et d'acétone, puis pendant 48 heures dans 5 l d'acétone. Après décantation, l'évaporation de ces solvants fournit un premier extrait

Les ascaris ont été ensuite traités pendant 30 heures par l'acétone à l'ébullition, ce qui a fourni un deuxième extrait.

Les ascaris, ainsi desséchés, ont été broyés, puis extraits par l'acétone au kumagawa (troisième extrait).

Les trois extraits ont été mélangés, ce qui a fourni 15,2 g de cire marron.

Chromatographie de l'extrait acétonique.

2,25 g de cette cire ont été chromatographiés sur 68 g d'Al₂O₃; 8 élu-tions de 200 cm³ ont élué au total 1,519 g. Les fractions 1, 2 et 3 (éluées par 200 cm³ de benzène-chloroforme 1 : 1 et 400 cm³ de chloroforme) ont fourni 1,176 g de produit constitué en majeure partie par des esters d'ascarosides.

Les fractions 5 et 6 (136 mg) ont été éluées par 400 cm³ de chloroforme-méthanol 9 : 1 et rechromatographiées sur 6 g de silicate-célite 2 : 1. 9 éluions de 20 cm³ ont permis de recueillir 113 mg de produit.

Les fractions 6 et 7 (24 mg), éluées par 20 cm³ de chloroforme-méthanol 98 : 2 et 20 cm³ de chloroforme-méthanol 95 : 5, ont été mélangées, cristallisées dans l'acétone et recristallisées dans un mélange de chloroforme et d'éther. On obtient ainsi des sphérules incolores, F. 81°, qui ne donnent pas d'abaissement de point de fusion de mélange avec l'ascaroside B, et dont le spectre infrarouge est identique à celui de l'ascaroside B.

Saponification de l'extrait acétonique - Obtention des ascarosides A, B et C.

12 g d'extrait acétonique ont été saponifiés par 120 cm³ de KOH méthanolique 2N à l'ébullition pendant 4 h. Après refroidissement et addition d'eau, on extrait à l'éther de la manière habituelle, et on obtient ainsi 5 g de cire jaune insaponifiable, que l'on chromatographie à chaud (37°) sur 150 g d'Al₂O₃.

11 éluions de 450 cm³ ont permis de recueillir au total 4,6 g de produit.

La fraction 5, éluee par du chloroforme contenant 0,5 % de méthanol, contient 227 mg de produit, qui fond, après cristallisation dans un mélange éther-chloroforme, à 76°-80°; il n'y a pas d'abaissement de point de fusion de mélange avec l'ascaroside A.

Les fractions 6 à 9, éluées par du chloroforme contenant de 0,5 à 3 % de méthanol, éluent 2,4 g de produit, fondant à 82°-84°, après cristallisation dans un mélange éther-chloroforme. Il n'y a pas de dépression de point de fusion de mélange avec l'ascaroside B.

La fraction 11, éluee par du chloroforme contenant 10 % de méthanol, fournit 37 mg de produit, fondant à 92°-94°, après cristallisation dans l'éther chloroforme.

Il n'y a pas d'abaissement de point de fusion de mélange avec l'ascaroside C.

III - PROPRIETES COMMUNES AUX ASCAROSIDES A, B et C

Hydrolyse acide des ascarosides.

L'hydrolyse acide des ascarosides est décrite ci-dessous, p.65, 70 et 80.

Dosage de l'ascarylose présent dans les ascarosides.

a) Etablissement de la courbe de référence.

On prépare une solution d'ascarylose (1,08 mg/cm³). On ajoute, à 0,5 cm³ de cette solution, 10 cm³ d'anthrone à 0,1 % dans l'acide sulfurique (concentration finale 54 µg/cm³). On prélève, de cette nouvelle solution, différentes prises d'essai, contenant des quantités connues d'ascarylose.

On ajoute ensuite du réactif jusqu'à un volume de 9 cm³, puis on ajoute 3 cm³ d'eau. Les prises d'essai, ayant donc un volume total de 12 cm³, sont chauffées 5 min. à 80°, puis soigneusement refroidies.

Les mesures se font alors au spectrophotomètre Unicam, et permettent de tracer la courbe des intensités d'absorption (à 490 mµ) en fonction de la quantité d'ascarylose.

b) Dosage de l'ascarylose présent dans les ascarosides

Les ascarosides A, B et C étant insolubles dans l'eau sont traités directement par l'anthrone sulfurique : on ajoute à une quantité donnée d'ascaroside (de 4 à 6 mg) une certaine quantité de réactif (de 10 à 25 cm³).

On prélève de cette solution différentes prises d'essai, calculées de manière à contenir de 10 à 20 μ g d'ascarylose. On traite ensuite ces prises d'essai de la manière décrite ci-dessus.

Les intensités d'absorption mesurées sont reportées sur la courbe de référence, d'où l'on déduit la quantité d'ascarylose présent dans la prise d'essai. Un calcul simple permet ensuite de déduire le pourcentage d'ascarylose dans chaque ascaroside (voir les résultats p. 20).

CHAPITRE II

ASCAROSIDE A

I - PROPRIETES ET DERIVES DE L'ASCAROSIDE A

L'ascaroside A fond à 79-80°, après cristallisation dans un mélange de chloroforme et d'éther; il se présente comme une poudre microcristalline incolore (voir le résultat des analyses p. 62).

Acétylation de l'ascaroside A.

348 mg d'ascaroside A sec, dissous dans 4 cm³ de pyridine sèche, sont additionnés de 4 cm³ d'anhydride acétique. On chauffe pendant deux heures à 70°. Après refroidissement, on ajoute de l'eau et on extrait à l'éther. Les extraits étherés sont lavés au carbonate de soude, puis à l'eau, et séchés sur sulfate de sodium. On obtient ainsi 378 mg de produit qu'on chromatographie sur 12 g d'alumine (élutions de 36 cm³).

172 mg sont élués par 108 cm³ d'un mélange éther de pétrole - benzène (1 : 1) et cristallisés dans l'alcool à 99°. On obtient le diacétate (II) sous forme de cristaux blancs, F. 49°-50°.

$C_{38}H_{72}O_6$	Calculé	C %	73,03	H %	11,61
	Trouvé		72,74		11,55

II - PROPRIETES ET DERIVES DE L'AGLYCONE A

Aglycone A.

65 mg d'ascaroside A sont soumis à l'hydrolyse acide dans les mêmes conditions que l'ascaroside B (voir ci-dessous, p. 70). On obtient ainsi une solution hydro-alcoolique de sucre et 43 mg d'aglycone dont une partie (35 mg) est chromatographiée sur 1 g d'Al₂O₃ (I) (élutions 3 cm³); 9 cm³ du mélange benzène-chloroforme (1 : 1) éluent 24 mg de produit qu'on cristallise deux fois dans l'acétone. On obtient l'aglycone A (III) sous forme de petits cristaux brillants, fondant à 69°-70°, et ne présentant pas d'absorption ultraviolette notable.

$C_{28}H_{58}O$	Calculé	C %	81,87	H %	14,23
	Trouvé		82,15		14,42
			81,45		14,21

Oxydation de l'aglycone A par l'acide chromique.

77,7 mg d'aglycone A sont dissous dans 6 cm³ d'acide acétique. On y ajoute 60 mg de CrO₃ dissous dans 7,5 cm³ d'acide acétique. On maintient le mélange à 40° pendant 16 h. En refroidissant, il se forme un précipité

blanc qu'on extrait à l'éther après avoir détruit l'excès d'acide chromique. On obtient ainsi 77 mg de produit qu'on chromatographie sur 2 g d'Al₂O₃ (I) (élutions de 8 cm³); 32 cm³ d'un mélange éther de pétrole-benzène (1 : 1) éluent 40 mg de produit qu'on cristallise dans l'acétone. On obtient une cétone (IV) sous forme d'une poudre microcristalline, F. 63°-65°, ne présentant pas d'absorption ultraviolette notable.

C ₂₈ H ₅₆ O	Calculé	C %	82,27	H %	13,81
	Trouvé		82,04		13,52

Déshydratation de l'aglycone A

883 mg d'aglycone A et 20 mg d'acide β-naphtalène-sulfonique sont introduits dans un tube à boules et chauffés à 150° sous 8 mm Hg pendant 3 heures, au cours desquelles on rajoute en deux fois 30 mg d'acide β-naphtalène-sulfonique. Puis, après avoir ajouté encore 10 mg de réactif, on distille sous 0,03 mm Hg. Le produit, distillant entre 160 et 200° (T. du bain d'air) est dissous dans l'éther, la solution étherée est lavée à la soude N et à l'eau, puis évaporée. On obtient ainsi 855 mg de produit qu'on chromatographie sur 50 g d'alumine (élutions 150 cm³). 789 mg sont élués par 150 cm³ d'éther de pétrole, cristallisés trois fois dans l'acétone et fournissent ainsi 639 mg de cristaux incolores fondant à 53,5°. Cette substance ne présente pas d'absorption dans l'ultraviolet. Il s'agit d'un mélange de carbures insaturés (V).

C ₂₈ H ₅₆	Calculé	C %	85,63	H %	14,37
	Trouvé		85,73		14,45
			85,57		14,40

Ozonisation du carbure insaturé A

311 mg du mélange de carbures insaturés (V) décrit ci-dessus sont dissous dans 5 cm³ de tétrachlorure de carbone et ozonisés pendant 3 heures. Après évaporation du tétrachlorure de carbone sous vide à température ordinaire, on ajoute de l'eau glacée et on décompose l'ozonide par chauffage. Les produits volatils sont entraînés par un courant d'azote dans une solution aqueuse de sulfate de 2,4-dinitro-phénylhydrazine. On recueille ainsi 15 mg d'un précipité de dinitrophénylhydrazone dont la chromatographie sur papier selon (25) montre qu'il s'agit d'un mélange de dinitro-phénylhydrazone de formaldéhyde et d'acétaldéhyde.

Les produits non volatils ont été chauffés dans l'eau à l'ébullition pendant 3 heures pour parfaire la décomposition de l'ozonide. L'extraction à l'éther du mélange réactionnel a permis d'obtenir 300 mg de produit, dont le dosage d'acidité montre qu'il contient environ 70 % de produit acide. Le mélange a été chromatographié sur 20 g de silicate-célite 2 : 1; il y a eu 21 élutions de 60 cm³. Les fractions 11 (42 mg) et 12 (49 mg), éluées par le mélange benzène-éther 9 : 1 et cristallisées dans l'éther de pétrole, fondent à 77°. Un dosage d'acidité a été effectué sur la fraction 11 : 2,25 mg consomment 0,054 cm³ de potasse méthanolique 0,1 N, ce qui correspond à un poids moléculaire de 364 (le poids moléculaire de l'acide hexacosanoïque C₂₆H₅₂O₂ est de 396).

Les analyses élémentaires ont donné les résultats suivants :

C ₂₆ H ₅₂ O ₂	Calculé	C %	78,72	H %	13,21
	Trouvé		78,91		13,10

Le diagramme de diffraction des rayons X, effectué par Madame Barbezat sur un échantillon de la fraction 12, a montré qu'il s'agissait d'acide hexacosanoïque (VI) impur.

Préparation du carbure saturé (VII) à partir du mélange de carbures insaturés (V).

160 mg du mélange des carbures insaturés V (voir ci-dessus) sont dissous à chaud dans 25 cm³ d'acide acétique. On y ajoute 65 mg de PtO₂. Le mélange est hydrogéné sous pression (50 kg) à 120° pendant 4 heures. Après refroidissement et séparation du catalyseur par filtration, on ajoute de l'eau et on extrait le mélange à l'éther; l'extrait étheré est lavé à la soude diluée puis à l'eau, et évaporé. On obtient 160 mg de produit qui cristallise dans l'éther en paillettes brillantes incolores F. 61°.

Ces cristaux sont purifiés 5 fois par chauffage à 130° dans SO₄H₂ concentré, et sont isolés de l'acide par une nouvelle extraction à l'éther; on recueille ainsi 103 mg qui sont chromatographiés sur 6 g d'alumine; 20 cm³ d'éther de pétrole éluent 103 mg de carbure saturé (VII) qui fond à 60-61° après cristallisation dans l'éther et recristallisation dans l'acétone.

C ₂₈ H ₅₈	Calculé	C %	85,19	H %	14,81
	Trouvé		85,47		14,91

Préparation du carbure saturé par réduction de la cétone (IV) selon Huang-Minlon (32).

A 180 mg de la cétone IV (voir p. 66), on ajoute 5 cm³ de diéthylène glycol (Eb. 238°) et 3 cm³ d'hydrate d'hydrazine à 99 %. Le mélange est porté à l'ébullition (138°) pendant 5 heures, puis concentré par distillation jusqu'à ce que la température atteigne 157°. Après avoir maintenu le mélange pendant 2 heures à cette température, on y ajoute 450 mg de KOH en pastilles, et on fait bouillir pendant 3/4 d'heure. On distille ensuite jusqu'à ce que la température atteigne 207° et on prolonge l'ébullition à cette température pendant 1h30; après refroidissement, on extrait le mélange à l'éther de la façon habituelle.

On isole ainsi 155 mg de produit qu'on chromatographie sur 5 g d'alumine (élutions de 15 cm³); 69 mg sont élués par 15 cm³ d'éther de pétrole et 83 mg par 30 cm³ de chloroforme. Ces dernières fractions contenant encore de l'azote, on recommence la réduction de la façon suivante : on ajoute à ces 83 mg, 2,3 cm³ de diéthylène glycol et 1,4 cm³ d'hydrate d'hydrazine. Après ébullition à 160°, on ajoute 200 mg de KOH, puis on fait bouillir à 192° pendant 2 heures, et à 207° pendant 3 heures. Après refroidissement et extraction à l'éther, on recueille 79 mg qui sont chromatographiés sur 5 g d'alumine. 20 cm³ d'éther de pétrole éluent 41 mg de produit qu'on mélange à la fraction correspondante de la première chromatographie (110 mg au total).

Ces 110 mg ont été purifiés à plusieurs reprises par chauffage dans l'acide sulfurique concentré. On obtient ainsi le carbure saturé (VII), F. 61-62°.

Le diagramme de rayons X de ce carbure n'a pas donné de résultats concluants.

CHAPITRE III

ASCAROSIDE B

I - PROPRIETES ET DERIVES DE L'ASCAROSIDE B

L'ascaroside B (VIII) se présente, après cristallisation dans un mélange d'éther et de chloroforme, sous forme de sphérules incolores, fondant à 82°-83° (voir le résultat des analyses élémentaires, p. 62).

Essai d'oxydation de l'ascaroside B par le tétracétate de plomb.

75 mg d'ascaroside B sont chauffés à 70° pendant plusieurs heures avec du tétracétate de plomb en solution dans le benzène.

Après extraction par le mélange chloroforme-éther, on récupère l'ascaroside B inchangé (pas de dépression du point de fusion de mélange avec l'ascaroside B authentique).

Essai de réduction de l'ascaroside B par l'hydruure de lithium et d'aluminium.

581 mg d'ascaroside B, dissous dans l'éther sec, sont ajoutés à 632 mg d'AlLiH₄. On chauffe à reflux pendant 3 h. On isole le produit de la réaction de la façon habituelle. On récupère 541 mg d'ascaroside B inchangé.

Acétylation de l'ascaroside B.

a) Mono et diacétate.

1,540 g d'ascaroside B sec, dissous dans 8 cm³ de pyridine séchée sont additionnés de 8 cm³ d'anhydride acétique. On chauffe pendant 2 h à 70°. Après refroidissement, on ajoute de l'eau et on extrait à l'éther; les extraits étherés sont lavés au carbonate de soude puis à l'eau, et séchés sur sulfate de sodium. On obtient ainsi 1,819 g de partie neutre qui sont chromatographiés sur 55 gm d'alumine (activité I); éluions de 165 cm³.

1	Ether de pétrole			traces
2	" "			traces
3	Ether de pétrole	+ benzène	9 : 1	traces
4	" "	"	3 : 1	traces
5	" "	"	1 : 1	traces
6	Benzène pur			77 mg
7	" "			72 mg
8	Benzène + éther		9 : 1	180 mg
9	" "		3 : 1	66 mg
10	" "		1 : 1	270 mg
11	Ether pur			441 mg
12	" "			552 mg
13	" "			109 mg
				1 769 mg

La fraction 8, cristallisée deux fois dans l'acétone donne des cristaux incolores fondant à 47°-48°; c'est le diacétate de l'ascaroside B.

$C_{41}H_{78}O_7$	Calculé	C %	72,09	H %	11,51
	Trouvé		71,82		11,27
			71,55		11,22

la fraction 11, cristallisée dans l'alcool, puis dans l'acétone, fond à 72°, c'est le monoacétate de l'ascaroside B.

$C_{39}H_{76}O_6$	Calculé	C %	73,07	H %	11,95
	Trouvé		73,11		11,53

la saponification par la potasse méthanolique 2 N des deux fractions redonne l'ascaroside B.

b) Triacétate.

151 mg d'ascaroside B, fondus et séchés à 100°, sous 0,02 mm, pendant 2-3 h, sont dissous dans 3 cm³ de pyridine sèche. En ajoutant 3 cm³ d'anhydride acétique, il se forme un précipité soluble à chaud. Le mélange est chauffé pendant 40 h à 45°, puis laissé pendant 24 h à la température ordinaire. On ajoute alors de l'eau, puis ClH 6 N; on épuise à l'éther. Après lavage à l'eau, au bicarbonate (2 fois) et à l'eau, on sèche l'extrait étheré sur sulfate de sodium. On obtient ainsi 182 mg de produit que l'on chromatographie sur 8,20 g de silicate de magnésium-célite (2 : 1); éluions de 25 cm³.

1	Ether de pétrole				0 mg
2	Ether de pétrole	+ benzène	9 : 1		0 mg
3	"	"	3 : 1		0 mg
4	"	"	3 : 1		0 mg
5	"	"	1 : 1		8 mg
6	"	"	1 : 1		59 mg
7	"	"	1 : 1		16 mg
8	Benzène pur				9 mg
9	"	"			35 mg
10	Benzène + éther		9 : 1		22 mg
11	"	"	3 : 1		19 mg
12	"	"	1 : 1		traces
					168 mg

Les fractions 6 et 9 sont cristallisées séparément dans un mélange acétone-méthanol.

La fraction 6 fond à 49,5-50°, la fraction 9 à 51°-52°; il n'y a pas d'abaissement de point de fusion du mélange de ces deux fractions et leur composition centésimale est la même; il s'agit dans les deux cas, du triacétate d'ascaroside B (IX)

$C_{43}H_{80}O_8$	Calculé	C %	71,22	H %	11,12	3 COCH ₃ %	18,15
	Trouvé fr. 6		70,89		10,99		19,2
	fr. 9		70,74		10,94		18,3

La saponification par la potasse méthanolique 2 N redonne l'ascaroside B, F. 83°.

Méthylation de l'ascaroside B.

Une solution de 373 mg d'ascaroside B dans 2 cm³ d'acétone et 15 cm³ d'iodure de méthyle est chauffée à reflux avec agitation magnétique, en pré-

sence d'oxyde d'argent, pendant 3 jours. L'oxyde d'argent, fraîchement préparé (à partir de 1 g de nitrate d'argent chaque fois), ainsi que 10 cm³ de ICH₃, sont ajoutés chaque jour. Les sels d'argent sont séparés par filtration et lavés au chloroforme bouillant. Après évaporation du filtrat on obtient 378 mg de produit que l'on chromatographie, en solution dans l'éther de pétrole, sur 12 g d'alumine (activité I) (élutions de 40 cm³); 120 cm³ d'un mélange d'éther de pétrole et de benzène (1 : 1) et 80 cm³ de benzène éluent 350 mg de substance qui, après cristallisation dans l'acétone, fournit une poudre blanche F 47°-49°, le triméthyl-O-ascaroside (X)

C ₄₀ H ₈₀ O ₅	Calculé	C %	74,94	H %	12,58	3 OCH ₃ %	14,51
	Trouvé		74,92		12,63		14,79
			74,69		12,27		14,30
			74,89		12,69		14,50

II - PROPRIETES ET DERIVES DE L'AGLYCONE B

Aglycone B (XI).

1,5 g d'ascaroside B, dissous dans 90 cm³ de méthanol contenant 2 cm³ de ClH 6 N, sont chauffés à reflux pendant 16 h. En refroidissant, des cristaux incolores précipitent. Après dilution par l'eau, on essore les cristaux; on les lave à l'eau jusqu'à neutralité, et on les sèche au dessiccateur; on recueille 1,188 g de produit brut. Le traitement du filtrat sera décrit ci-dessous (ascarylose).

564 mg d'aglycone sont chromatographiés à chaud (37°) sur 17 g d'Al₂O₃ (I) (élutions de 60 cm³).

450 mg sont élués par 180 cm³ d'un mélange de benzène et de chloroforme (1 : 1). Après avoir cristallisé deux fois dans un mélange d'éther et de chloroforme, on obtient des paillettes brillantes F. 93°-94° de dihydroxy-hentriacontane (XI).

C ₃₁ H ₆₄ O ₂	Calculé	C %	79,41	H %	13,76
	Trouvé		79,21		13,69
			79,16		13,52
			79,11		13,79

Acétylation de l'aglycone B.

187 mg d'aglycone B, dissous dans 4 cm³ de pyridine sèche, sont additionnés de 4 cm³ d'anhydride acétique. Il se forme un précipité soluble à chaud. On chauffe deux heures à 70°. On isole le produit de la réaction de la manière habituelle et on obtient ainsi 211 mg de produit brut que l'on chromatographie sur 9 g de silicate-célite (2 : 1) (élutions de 30 cm³).

142 mg sont élués par 90 cm³ d'un mélange d'éther de pétrole et de benzène (3 : 1) et 60 cm³ d'un mélange d'éther de pétrole et de benzène (1 : 1). Chaque fraction, cristallisée séparément dans du méthanol, fond à 50°-52°. On mélange toutes les fractions et après recristallisation dans l'acétone, on obtient des cristaux soyeux, fondant à 52°-53°, de diacétoxy-hentriacontane (XII).

C ₃₅ H ₆₈ O ₄	Calculé	C %	76,04	H %	12,40	2 COCH ₃ %	15,57
	Trouvé		76,25		12,62		15,56
			76,17		12,52		
			76,45		12,58		

Méthylation de l'aglycone B

412 mg d'aglycone B sont méthylés dans les mêmes conditions que l'ascaroside B (voir ci-dessus p. 69). On obtient 382 mg de produit brut. On chromatographie 342 mg sur 12 g d' Al_2O_3 ; 60 cm^3 de benzène éluent 122 mg de substance qui sont rechromatographiés sur 3 g d' Al_2O_3 (élutions de 10 cm^3).

24 mg sont élués par 20 cm^3 d'éther de pétrole-benzène (2 : 1) et cristallisés dans l'acétone. On obtient ainsi le diméthoxyhentriacontane (XIII) sous forme de cristaux incolores, F. 49-51°, dont le spectre IR ne contient pas de bande OH.

41 mg sont élués par 30 cm^3 d'éther de pétrole-benzène (1 : 2); après cristallisation dans l'éther de pétrole, on obtient des cristaux de méthoxyhydroxy-hentriacontane, fondant à 70°-71°.

$\text{C}_{32}\text{H}_{66}\text{O}_2$	Calculé	1 OCH_3 %	6,42
	Trouvé		6,28

Dioxohentriacontane (XIV)

466 mg d'aglycone B, dissous à chaud dans 30 cm^3 d'acide acétique (distillé sur CrO_3), sont additionnés de 500 mg de CrO_3 , dissous dans 60 cm^3 d'acide acétique; après un contact de 10 h à la température ordinaire, il se forme des cristaux brillants que l'on essore sur "verre fritté". On lave au benzène plusieurs fois et on sèche au dessiccateur. On recueille ainsi 412 mg de cristaux qui sont chromatographiés à chaud sur 12 g Al_2O_3 (37°). 285 mg sont élués par 250 cm^3 de CCl_4 , 101 mg par 50 cm^3 d'un mélange CCl_4 -benzène (1 : 1), 50 cm^3 de benzène, et 50 cm^3 d'un mélange benzène-éther (9 : 1).

La fraction éluee par le CCl_4 , cristallisée dans un mélange éther-chloroforme, donne des aiguilles soyeuses fondant à 100°-101°.

$\text{C}_{31}\text{H}_{60}\text{O}_2$	Calculé	C %	80,10	H %	13,01
	Trouvé		80,34		13,36
			79,84		13,41

Dioxime du dioxohentriacontane.

On dissout 79 mg de dioxohentriacontane (XVI), 166 mg de NH_2OH , HCl , et 225 mg d'acétate de sodium fondu dans 20 cm^3 d'alcool à 95° bouillant. On chauffe à reflux pendant 16 h et on isole le produit de la réaction par extraction à l'éther. On obtient 78 mg de substance que l'on chromatographie sur 2,3 g d' Al_2O_3 à chaud (46°). Il y a eu 18 éluutions de 7 cm^3 chacune. Les fractions 13-16, éluées par le chloroforme, donnent, après cristallisation dans le benzène une poudre incolore F. 88°-90°.

$\text{C}_{31}\text{H}_{62}\text{O}_2\text{N}_2$	Calculé	C %	75,24	H %	12,63	N %	5,66
	Trouvé		75,67		12,00		5,40

Hydroxy-oxo-hentriacontane.

308 mg d'aglycone B, dissous à chaud dans 15 cm^3 d'acétone distillée sur MnO_4K , et additionnés de 580 mg de MnO_4K , sont chauffés à reflux, avec agitation magnétique, pendant 4 h; le lendemain on évapore l'acétone sous vide, on ajoute de l'eau et on fait barboter du SO_2 jusqu'à décoloration. On éprise plusieurs fois au chloroforme. Les extraits chloroformiques sont lavés à la soude, à l'eau et séchés. Après évaporation on obtient 268 mg de partie neutre.

Après cristallisation dans le benzène, puis dans l'acétone, on obtient l'hydroxy-oxo-hentriacontane sous forme de petites aiguilles brillantes F. 87,5-88°.

$C_{31}H_{62}O_2$	Calculé	C %	79,76	H %	13,39
	Trouvé		79,41		13,18

Monoxime.

80 mg d'hydroxycétone sont dissous dans 6 cm³ d'alcool à 90°; on y ajoute une solution de 138 mg de NH₂OH, ClH et de 221 mg d'acétate de Na dans 10 cm³ d'alcool à 90 %. On chauffe 16 h à reflux. On évapore l'alcool, on reprend par l'eau et on épuise à l'éther. On obtient ainsi 86 mg de produit. Après cristallisation dans le benzène, l'acétone, puis dans un mélange de benzène et d'éther de pétrole, on obtient une poudre amorphe F. 88°.

$C_{31}H_{63}O_2N$	Calculé	C %	77,27	H %	13,18	N %	2,90
	Trouvé		77,20		13,29		2,49

Oxydation de l'hydroxy-oxo-hentriacontane par l'acide chromique.

122 mg d'hydroxy-oxo-hentriacontane sont oxydés de la même manière que l'aglycone B (voir ci-dessus). Il se forme après refroidissement, des cristaux brillants que l'on essore. On recueille 92 mg qui, après cristallisation dans le benzène puis dans un mélange chloroforme-éther, donnent des cristaux brillants F. 98°-100° identiques à la dicétone (XIV) (pas de dépression de point de fusion du mélange, obtention d'une dioxime F. 89°).

Oxydation d'ascaroside B par le permanganate de potassium.

476 mg d'ascaroside B sont additionnées de 20 cm³ d'acétone (distillée sur MnO₄K) et de 740 mg de MnO₄K pulvérisé puis chauffés à reflux avec agitation. Après 3 h, tout le MnO₄K a été consommé; on rajoute alors 900 mg de MnO₄K en deux fois et on continue à chauffer à reflux pendant 5 h. On sépare le précipité par filtration sous vide. Le précipité est mis en suspension dans l'eau et on fait barboter du SO₂ jusqu'à destruction du MnO₄K. Il reste un précipité blanc que l'on épuise à l'éther. L'extract éthéré est lavé à la soude, on obtient ainsi 37 mg de partie neutre. Ceux-ci, additionnés des 120 mg obtenus par évaporation du filtrat acétonique sont chromatographiés à chaud (37°) sur 4 g d'Al₂O₃; il y a eu 12 éluions de 12 cm³.

Les 3 premières fractions (61 mg), éluées par le CCl₄ et cristallisées dans l'acétone, fondent à 98-100° et ne donnent pas de dépression de point de fusion du mélange avec le dioxohentriacontane (XIV).

$C_{31}H_{60}O_2$	Calculé	C %	80,10	H %	13,01
	Trouvé		79,71		13,65

Les fractions 11 et 12 (42 mg), éluées par un mélange benzène-chloroforme (9 : 1) et par du chloroforme pur, cristallisées deux fois dans l'acétone, fondent à 87°-88° (pas de dépression de point de fusion de mélange avec l'hydroxy-oxohentriacontane).

$C_{31}H_{62}O_2$	Calculé	C %	79,76	H %	13,39
	Trouvé		79,41		13,52

Réduction du dioxohentriacontane en carbure par la réaction de Huang-Minlon.

206 mg de dicétone (XIV) sont chauffés à reflux avec 7 cm³ d'éthylène-glycol et 4 cm³ d'hydrate d'hydrazine à 99 % pendant 5 h. La température d'ébullition de ce mélange est 130°. On concentre la solution jusqu'à ce que

la température atteint 154°; on maintient cette température pendant 2 heures. On ajoute alors 500 mg de KOH en pastilles et on chauffe de nouveau à reflux pendant 45 min.

Puis on concentre la solution jusqu'à ce que la température atteigne 205-210°; on maintient cette température pendant 2 h. Après refroidissement on dilue par l'eau et on isole le produit de la réaction de la manière usuelle.

On obtient ainsi 188 mg de produit que l'on chromatographie sur 6 g d' Al_2O_3 (élutions de 20 cm^3).

148 mg sont élués par 20 cm^3 d'éther de pétrole et purifiés en chauffant à 130° pendant 2 h avec SO_4H_2 concentré. On recommence trois fois jusqu'à ce que l'acide ne se colore plus. On extrait par l'éther additionné de CHCl_3 , on rechromatographie sur 5 g d' Al_2O_3 et on obtient 141 mg qu'on traite encore 2 fois de la même façon par SO_4H_2 , qui reste incolore.

Après extraction par un mélange d'éther et de chloroforme, on obtient 138 mg de produit, qui, cristallisé dans l'éther, donne 112 mg de belles palettes fondant à 68°-69°. Il s'agit du carbure saturé $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$ (XV).

$\text{C}_{31}\text{H}_{64}$	Calculé	C %	85,23	H %	14,77
	Trouvé		85,15		14,81

Synthèse de l'hentriacontane normal.

On effectue la réaction de Huang-Minlon sur 198 mg de palmitone, en employant 5 cm^3 de diéthylène glycol, et 4 cm^3 d'hydrate d'hydrazine à 99 % suivant la description ci-dessus.

Après purification et cristallisation dans l'éther on obtient 98 mg de carbure $\text{C}_{31}\text{H}_{64}$, F. 68°-69°.

$\text{C}_{31}\text{H}_{64}$	Calculé	C %	85,23	H %	14,77
	Trouvé		84,96		14,71

Synthèse du dotriacontane normal.

1,4 g d'iodure de cétyle (préparé à partir d'alcool cétylique, lui-même obtenu par réduction du palmitate de méthyle au moyen de LiAlH_4) sont dissous dans 55 cm^3 de xylène sec et sont additionnés de 250 mg de sodium. Le mélange est chauffé à reflux pendant 4 h.

En refroidissant, il se forme un précipité rose qu'on sépare par filtration. On concentre le filtrat sous vide jusqu'à 10 cm^3 et on précipite par l'alcool. On essore et on obtient 160 mg de produit* que l'on chromatographie sur 7 g d' Al_2O_3 . 60 cm^3 d'éther de pétrole éluent 158 mg de carbure qu'on purifie par un traitement avec SO_4H_2 concentré (3 fois). Après extraction on recueille 147 mg de carbure qu'on cristallise deux fois dans l'éther : F. 68°-69°.

$\text{C}_{32}\text{H}_{66}$	Calculé	C %	85,24	H %	14,76
	Trouvé		85,09		14,86

* En concentrant les eaux-mères et en procédant de la même manière, on obtient une quantité supplémentaire de carbure.

III - DEGRADATION DE L'AGLYCONE B

Déshydratation de l'aglycone B.

1,034 g d'aglycone B (XI) et 12 mg d'acide β -naphtalène-sulfonique sont introduits dans un tube à boule et placés dans un bain d'huile à 150°. Après la fusion, on continue à chauffer à cette température, sous 15 mm Hg pendant 3 h, en rajoutant en 2 fois 28 mg d'acide β -naphtalène-sulfonique. Puis, après avoir rajouté 12 mg de réactif, on distille sous 0,07 mm Hg. Le produit distillant entre 180° et 210° (t. du bain d'air) est dissous dans l'éther, la solution étherée est lavée à la soude et à l'eau. On recueille ainsi 895 mg de produit neutre qu'on chromatographie sur 27 g d'Al₂O₃ (I).

808 mg, élués par 80 cm³ d'éther de pétrole et cristallisés deux fois dans l'acétone, donnent 705 mg de carbure insaturé (XVI) sous forme de cristaux transparents, brillants, fondant à 57°-58°.

C ₃₁ H ₆₀	Calculé	C %	86,08	H %	13,80
	Trouvé		86,03		13,97
			85,99		13,98

Le spectre IR ne montre plus de bande OH, et le spectre U. V. ne montre pas d'absorption notable.

Ozonisation du carbure insaturé C₃₁H₆₀ (XVI).

618 mg de diène C₃₁H₆₀, dissous dans 20 cm³ de chloroforme et refroidis à 0°, sont soumis à l'action d'un courant d'oxygène ozonisé pendant 6h. On ajoute alors de l'eau glacée et on décompose l'ozonide par chauffage au bain-marie à 50-60°. Les produits volatils sont entraînés dès leur formation par un courant d'azote dans une solution aqueuse de sulfate de 2,4-dinitro-phénylhydrazine. On recueille ainsi 150 mg d'un précipité de dinitrophénylhydrazone qui, recristallisé dans le méthanol, donne des prismes jaunes fondant à 153-157°. Le mélange avec la 2,4-dinitrophénylhydrazone d'acétaldéhyde ne présente pas de dépression de point de fusion.

C ₈ H ₈ O ₄ N ₄	Calculé	C %	42,86	H %	3,60	N %	24,99
	Trouvé		43,05		3,53		24,74

On évapore ensuite le chloroforme du mélange réactionnel débarrassé d'acétaldéhyde et on chauffe à reflux après avoir ajouté 3 cm³ d'H₂O₂ à 110 Vol. Un entraînement à la vapeur d'eau permet d'isoler de l'acide acétique qui a été identifié sous forme d'hydroxamate par chromatographie sur papier, ainsi que les acides malonique et succinique, identifiés par chromatographie sur papier selon Löffler et Reichl.

La partie non entraînée est extraite à l'éther et au chloroforme. On isole ainsi 590 mg de produit que l'on méthyle par le diazométhane. Les esters (627 mg) sont chromatographiés sur 30 g de silicate de Mg-célite (2 : 1). Il y a eu 13 éluions. La 2ème fraction (36 mg) éluee par un mélange d'éther de pétrole-benzène (3 : 1) est cristallisée dans l'acétone. On obtient des cristaux brillants fondant à 64-65°. Il s'agit de l'ester méthylique de l'acide hexacosanoïque.

C ₂₇ H ₅₄ O ₂	Calculé	C %	78,96	H %	13,25	1 OCH ₃ %	7,52
	Trouvé		78,54		13,60		6,78

22 mg de ces cristaux sont saponifiés par 2 cm³ de KOH méthanolique 2N. On isole 19 mg d'acide qui distille entre 180° et 230° (Temp. du bain d'air) sous 0,04 mm. Après cristallisation du distillat dans le benzène, on

obtient l'acide hexacosanoïque sous forme d'une poudre cristalline fondant à 81-82°.

$C_{26}H_{52}O_2$	Calculé	C %	78,72	H %	13,21
	Trouvé		78,68		13,29

2,93 mg de cet acide consomment 0,066 cm³ de KOH méthanolique 0,1 N ce qui correspond à un poids moléculaire de 442.

1,43 mg consomment 0,0328 cm³ de KOH 0,1 N ce qui correspond à un poids moléculaire de 436. (P.M. calculé pour $C_{26}H_{52}O_2$: 396).

La 5ème fraction (106 mg) éluee par du benzène, est cristallisée dans l'acétone et recristallisée dans l'éther de pétrole. On obtient des aiguilles blanches F. 75°-76°.

$C_{33}H_{66}O_4$	Calculé	C %	75,22	H %	12,63	2 OCH ₃ %	11,78
	Trouvé		75,40		12,62		13,52
			75,32		12,40		13,80

Oxydation de l'aglycone B selon Bickel, Schmid et Karrer (35).

14 mg d'aglycone B sont introduits dans un ballon avec 20 cm³ d'acide chromique préparé selon (27). Le mélange est chauffé à l'ébullition et immédiatement distillé, le volume étant maintenu constant par addition d'eau distillée. Après avoir recueilli 35 cm³ de distillat, ce qui dure environ une heure, on neutralise celui-ci par l'éthylamine à 33 % jusqu'au virage du vert de bromocrésol. La solution de sels d'éthylamine ainsi obtenue est concentrée sous vide à 35-40° jusqu'à un volume de 0,5 cm³ environ, puis chromatographiée sur papier selon (27).

IV - FORMULE DEVELOPPEE DE L'AGLYCONE B

Oxydation du dioxohentriacontane par l'hypoiodite de sodium.

723 mg de dioxo-hentriacontane (XIV) sont dissous à chaud dans 40 cm³ de dioxane. On y ajoute, à 40°, 45 cm³ de NaOH aqueuse à 10 % et 150 cm³ d'iode à 10 % (alternativement et en plusieurs fois).

Le mélange contenant de l'iode en excès est alors maintenu à 40° avec agitation mécanique pendant 3 jours. Après refroidissement le précipité est séparé par filtration sous vide et séché, puis il est extrait par du chloroforme bouillant. On recueille ainsi 121 mg de produit soluble dans le chloroforme (dicétone non réagit (XIV)). La partie insoluble est reprise par 100 cm³ d'alcool à 95° et acidifiée par 20 cm³ de SO₄H₂ 6 N.

Après addition d'eau, on isole de la manière usuelle 516 mg de produit acide, qui fournit, après deux cristallisations dans le benzène, des sphères blanches F. 88°-95°, qui sont méthylées par le diazométhane.

312 mg d'ester sont chromatographiés sur 14 g de silicate de magnésium-célite (2 : 1) (élutions de 50 cm³). 81 mg de produit sont élués par 200 cm³ de benzène et cristallisés deux fois dans l'éther : on obtient des aiguilles brillantes F. 75°-76°, dont les analyses ne correspondent pas au céto-ester $C_{31}H_{60}O_3$ attendu :

$C_{32}H_{64}O_4$	Calculé	C %	74,94	H %	12,58	1 OCH ₃ %	6,04
	Trouvé		75,23		12,57		11,85
			74,83		11,82		11,72

182 mg de produit sont élués par 150 cm³ d'un mélange benzène-éther (9 : 1) et cristallisés trois fois dans l'éther de pétrole. On obtient une poudre blanche F. 75°5-77°5.

C ₃₂ H ₆₄ O ₅	Calculé	C %	72,95	H %	11,86	1 OCH ₃ %	5,87
	Trouvé		72,91		12,01		10,15
			72,28		12,26		9,22

Oxydation du dioxohentriacontane selon King (38). Acide cétotriacontanoïque.

531 mg (1,12 millimoles) de dicétone (XIV), dissous dans 10 cm³ de pyridine, sont additionnés de 305 mg d'iode (1,2 millimoles); le mélange est maintenu pendant 2h30 à 100° et 18 h à température ordinaire. En refroidissant, il se forme un précipité brun. Après avoir évaporé la pyridine sous pression réduite, on ajoute du méthanol pour dissoudre l'iodhydrate de pyridine qu'on sépare par filtration du précipité d'iodure d'alkyle-pyridinium.

Celui-ci est ensuite dissous dans 15 cm³ d'alcool à 95° et saponifié par 15 cm³ de KOH éthanolique 2N, à l'ébullition pendant 5 heures. On laisse ensuite le mélange réactionnel à la température ordinaire pendant 36 heures. Après addition d'eau et extraction au chloroforme, on obtient 409 mg de produit acide.

332 mg de l'extract chloroformique ont été chromatographiés sur 15 g de silicate celite 2 : 1. Il y a eu 14 éluions de 50 cm³ et 293 mg de produit ont été recueillis au total.

169 mg de dicétone non réagie ont été élués par 50 cm³ de benzène-chloroforme 1 : 1, 200 cm³ de chloroforme et 100 cm³ de chloroforme-méthanol 99 : 1 (élution 2 à 8).

117 mg d'acide (poids moléculaire mesuré par acidimétrie = 700) ont été élués par 150 cm³ de chloroforme-méthanol 98 : 2, 50 cm³ de chloroforme 95 : 5 et 50 cm³ de chloroforme 9 : 1 (élutions 9 à 13).

La fraction 10 (41 mg), cristallisée dans un mélange chloroforme-acétone (F. 97°-99°) et recristallisée dans du benzène fournit des cristaux incolores F. 99°-100°.

Le dosage d'acidité a donné les résultats suivants :

1,43 mg consomment 0,0286 cm³ de potasse méthanolique 0,1 N (P.M. 500)

1,18 mg consomment 0,0255 cm³ de potasse méthanolique 0,1 N (P.M. 463)

Le poids moléculaire théorique du céto-acide C₃₀H₅₈O₃ est de 466.

C ₃₀ H ₅₈ O ₃	Calculé	C %	77,19	H %	12,53
	Trouvé		77,35		12,82

Le spectre I.R. montre une forte bande CO à 5,89 μ.

Lactol.

2,8 g de dicétone (XIV) et 1,54 g d'iode, dissous dans 25 cm³ de pyridine ont été traités comme ci-dessus. L'iodure d'alkyle-pyridinium obtenu a été dissous dans 20 cm³ d'alcool et saponifié par 90 cm³ de potasse à l'ébullition pendant 17 heures; le mélange a été acidifié par ClH et porté à l'ébullition pendant 3/4 d'heure; après addition d'eau et extraction au chloroforme, on obtient 2,4 g de produit qu'on chromatographie sur 225 g d'acide silicique-celite 2 : 1. 11 éluions de 675 cm³ ont permis de recueillir 2,1 g au total.

675 cm³ de benzène-chloroforme 3 : 1, 1 350 cm³ de benzène-chloroforme 1 : 1 et 675 cm³ de chloroforme éluent 980 mg de dicétone non réagie.

675 cm³ de chloroforme et 2025 cm³ de chloroforme-méthanol (99 : 1) (élutions 6, 7, 8 et 9) éluent 809 mg de produit fondant vers 80-85°. Les fractions 7, 8 et 9 sont constituées par un mélange de dicétone non réagie (XIV), de lactol (XVIII) et de cétoacide (XVII).

La fraction 6 (215 mg) a été rechromatographiée sur 20 g de silicate-célite 2 : 1. Sept élutions de 60 cm³ ont permis d'éluer 202 mg de produit.

109 mg ont été élués par 60 cm³ de benzène-chloroforme (1 : 1), et cristallisés dans l'éther de pétrole. Il s'agit d'un mélange, fondant entre 80° et 90°, constitué vraisemblablement de dicétone (XIV) et de lactol (XVIII).

74 mg ont été élués par 60 cm³ de benzène-chloroforme (1 : 1). Après deux cristallisations dans l'éther de pétrole, on obtient un produit neutre, F. 83°-84°, dont le spectre I.R. montre une bande OH à 2,85 μ et une bande CO à 5,80 μ. Il s'agit du lactol C₃₀H₅₈O₃ (XVIII).

C ₃₀ H ₅₈ O ₃	Calculé	C %	77,19	H %	12,53
	Trouvé		77,85		12,76

Les eaux-mères ont été saponifiées par la potasse méthanolique à l'ébullition; 18 mg ont consommé 0,338 cm³ de KOH à 0,1 N, ce qui correspond à un poids moléculaire de 535 (poids moléculaire théorique 466).

Enol-lactone (XIX).

37 mg de lactol (XVIII), dissous dans 18 cm³ de benzène sec et additionnés de 9 mg d'acide p. toluène sulfonique, ont été chauffés à l'ébullition pendant 11 heures. Après addition d'eau et extraction à l'éther, les extraits étherés ont été lavés de nombreuses fois à l'eau, séchés sur SO₄Na₂ et évaporés. On recueille ainsi 43 mg de produit qu'on chromatographie sur 5 g de silicate-célite (2 : 1). Sept élutions de 15 cm³ éluent au total 31 mg de produit.

22 mg de produit ont été élués par 45 cm³ de benzène-éther (9 : 1) et cristallisés deux fois dans l'éther de pétrole. On obtient ainsi des cristaux incolores fondant à 72°-74°, dont le spectre I.R. ne montre plus de bande OH, mais une bande d'insaturation à 6,05 μ.

V - FORMULE PARTIELLE DE L'ASCAROSIDE B

Hydrolyse acide du triméthyl-O-ascaroside

95 mg de triméthyl-O-ascaroside B (X) (voir p. 69) sont chauffés à reflux pendant 16 h dans 10 cm³ d'alcool à 90° contenant 0,6 cm³ SO₄H₂ 4 N. Après extraction à l'éther, on recueille 90,5 mg de cire blanche qui sont chromatographiés sur 2,7 g d'Al₂O₃ (élutions de 9 cm³).

37 mg sont élués par 18 cm³ d'un mélange de benzène et d'éther (9 : 1). Après cristallisation dans l'acétone on obtient des cristaux F. 70°-72°. Il s'agit d'un dérivé monométhoxylé de l'aglycone B, le méthoxyhydroxyhentriacontane (XX).

C ₃₂ H ₆₆ O ₂	Calculé	C %	79,59	H %	13,73	1 OCH ₃ %	6,42
	Trouvé		78,94		13,61		6,90

Son spectre I.R. est identique à celui du dérivé monométhoxylé de l'aglycone B (voir p. 71).

Déshydratation du méthoxyhydroxyhentriacontane (XX).

495 mg d'aglycone B monométhoxylé (XX) sont introduits dans un tube

à boules et déshydratés dans les mêmes conditions que l'aglycone B (voir ci-dessus p. 74), puis distillés sous 0,02 mm entre 180 et 230° (T. du bain d'air). On recueille ainsi 441 mg de produit qu'on chromatographie sur 15 g d'alumine (élutions de 50 cm³).

387 mg de produit sont élués par 100 cm³ d'éther de pétrole, cristallisés dans l'acétone (F. 40-45°), et rechromatographiés sur 18 g de silicate-célite (2 : 1); il y a eu 8 élutions de 50 cm³.

Les fractions 2 à 7 (334 mg), éluées par 200 cm³ d'éther de pétrole, 50 cm³ d'éther de pétrole-benzène (9 : 1), et 50 cm³ d'éther de pétrole-benzène (3 : 1), sont cristallisées séparément dans l'acétone en donnant des cristaux incolores F. 55-57°. Il s'agit d'un mélange de méthoxyhentriacontènes (XXI et XXII).

Analyse d'un échantillon de la fraction 3.

C ₃₂ H ₆₄ O	Calculé	C %	82,68	H %	13,88	10CH ₃ %	6,27
	Trouvé		82,62		13,79		6,84

Ozonisation du mélange de méthoxy-hentriacontènes

200 mg de méthoxyhentriacontènes (XXI et XXII) ont été dissous dans environ 5 cm³ de chloroforme et ozonisés pendant trois heures; après évaporation du chloroforme sous vide à froid et addition d'eau glacée, nous avons obtenu en opérant de la manière décrite p. 74, la dinitrophénylhydrazone d'acétaldéhyde, que nous avons chromatographiée sur papier selon (25) et cristallisée deux fois dans le méthanol (F. 153-162°).

C ₈ H ₈ O ₄ N ₄	Calculé	C %	42,86	H %	3,60
	Trouvé		42,96		3,87

Nous avons ensuite effectué sur le mélange réactionnel un entraînement à la vapeur d'eau; le distillat réagit avec la dinitrophénylhydrazine en donnant un précipité que nous avons chromatographié sur papier selon (25); la chromatographie révèle deux taches, correspondant aux dinitrophénylhydrazones d'acétaldéhyde et de formaldéhyde.

CHAPITRE IV

ASCAROSIDE C

I - PROPRIETES ET DERIVES DE L'ASCAROSIDE C

L'ascaroside C (XXIII) se présente, après cristallisation dans un mélange d'éther et de chloroforme, sous forme de sphérules incolores, F. 93-95°, $[\alpha]_D = -77.5$ (dans le chloroforme). Voir p. 62 le résultat des analyses élémentaires.

Acétylation de l'ascaroside C

119 mg d'ascaroside C sont dissous dans 2 cm³ de pyridine et additionnés de 2 cm³ d'anhydride acétique. On laisse en contact pendant 40 h à 45° puis 24 h à la température ordinaire. On isole de la manière usuelle 139 mg de produit qu'on chromatographie sur 7 g de silicate de magnésium-célite (2 : 1) (élutions de 25 cm³). 78 mg sont élués par 100 cm³ de benzène, 43 mg par un mélange de benzène-éther (9 : 1). Après cristallisation dans le méthanol, les deux fractions présentent le même double point de fusion à 38° et 49-50° et les mêmes analyses élémentaires, correspondant au tétracétate d'ascaroside C (XXIV).

$C_{51}H_{92}O_{12}$	Calculé	C %	68,30	H %	10,27	4 COCH ₃ %	19,20
	Trouvé		68,28		9,52		
			68,57		10,38		19,70
			68,39		10,08		19,20

La saponification du tétracétate par la potasse méthanolique 2 N fournit l'ascaroside C.

Méthylation de l'ascaroside C.

305 mg d'ascaroside C sont méthylés par l'iodure de méthyle en présence d'oxyde d'argent dans les mêmes conditions que l'ascaroside B (voir ci-dessus p. 69). Au total 30 cm³ d'iodure de méthyle et l'oxyde d'argent provenant de 2 g de NO₃Ag ont été utilisés. On obtient 344 mg de produit qui sont chromatographiés sur 11 g d'Al₂O₃ (I) (élutions de 35 cm³). 35 cm³ d'un mélange benzène-éther (9 : 1) éluent 228 mg de produit qu'on cristallise dans l'alcool. On obtient une poudre F. 43°-44°. Il s'agit du tétraméthyl-O-ascaroside C (XXV).

$C_{47}H_{92}O_8$	Calculé	C %	71,89	H %	11,81	4 OCH ₃ %	15,80
	Trouvé		72,13		11,82		15,70

II - AGLYCONE C

Hydrolyse acide de l'ascaroside C.

314 mg d'ascaroside C sont hydrolysés dans les mêmes conditions que l'ascaroside B (voir p. 70); on obtient 207 mg d'aglycone qu'on chromatographie sur 7 g d'Al₂O₃ (I) (élutions de 20 cm³); 60 cm³ de chloroforme éluent 113 mg de produit qui, cristallisés dans un mélange chloroforme-acétone, donnent des cristaux brillants F. 93-94°; 47 mg sont élués par 40 cm³ d'un mélange chloroforme-méthanol 1 % et cristallisés comme ci-dessus, ils donnent les mêmes cristaux F. 93°-94°.

C ₃₁ H ₆₄ O ₂	Calculé	C %	79,41	H %	13,76
	Trouvé		79,18		13,50

Le spectre I. R. de l'aglycone C est identique à celui de l'aglycone B (XI). Le mélange des deux aglycones ne donne pas d'abaissement de point de fusion.

III - FORMULE PARTIELLE DE L'ASCAROSIDE C

Hydrolyse acide du tétraméthyl-O-ascaroside C (XXV).

171 mg de tétra-éther méthylique F. 43 (XXV) sont hydrolysés dans les mêmes conditions que les ascarosides (voir ci-dessus p. 70); le précipité qui se forme après refroidissement est séparé et cristallisé dans un mélange d'éther et de chloroforme. On obtient des cristaux transparents F. 94°, exempts de méthoxyle et dont le spectre I. R. est identique à celui du dihydroxyhentriacontane (XI) obtenu par hydrolyse de l'ascaroside C.

CHAPITRE V

ASCARYLOSE

I - PREUVES DE LA PRESENCE D'UN SUCRE DANS L'HYDROLYSAT D'ASCAROSIDE

Réaction de Ikawa et Nieman.

Une quantité donnée de sucre est dissoute dans 100 cm³ d'eau. On ajoute, en refroidissant, à 1 cm³ de la solution ainsi obtenue, 1 cm³ d'eau et 8 cm³ de SO₄H₂ concentré, et on chauffe à 100° pendant 15 minutes. Après refroidissement, on mesure l'absorption dans l'ultraviolet avec un spectrophotomètre Beckmann DU

	mg	concentration mg/cm ³	λ max.	ε
Ribose	11	0,011	255	4260
			315	12150
Fructose	9	0,009	230	1880
			255	2560
			320	7580
Ascarylose	6	0,006	230	3300
			322,5	7500

II - ISOLEMENT ET DESCRIPTION DE L'ASCARYLOSE

Isolement de l'ascarylose

790 mg d'ascaroside B sont chauffés à reflux pendant 16 heures dans 50 cm³ de méthanol contenant 1 cm³ de ClH₆N. Après refroidissement et addition d'eau, la solution hydroalcoolique obtenue par filtration du mélange réactionnel est débarrassée du méthanol par évaporation sous vide.

La solution aqueuse, encore acide, est chauffée à l'ébullition pendant 2 heures pour hydrolyser le méthylglycoside qui s'est formé dans les conditions employées.

Après refroidissement, la solution est neutralisée par du CO₃Ag₂ et filtrée. On fait barboter SH₂ dans le filtrat jusqu'à précipitation totale des sels d'argent qu'on élimine par une nouvelle filtration. Après évaporation de l'eau sous vide, on obtient un sirop légèrement jaune, que l'on dissout dans l'acétone; on filtre la solution pour éliminer les dernières traces de sels d'argent. On obtient ainsi 185 mg de sirop (quantité théorique pour 1 mol. d'ascarylose : 193 mg) qu'on purifie par deux distillations sous 0,05 mm (temp. du bain d'air : 125°-135°).

$C_6H_{12}O_4$	Calculé	C %	48,64	H %	8,16	1 C-CH ₃ %	10,15
	Trouvé		48,63		8,28		9,87
			48,83		8,23		

Isolement de l'ascarylose à partir de l'extrait acétonique d'ascaris.

L'extrait acétonique brut d'ascaris a été chromatographié (voir p. 62). Les fractions constituées par des esters d'ascarosides ont été mélangées (406 mg), dissoutes dans 90 cm³ de méthanol, additionnées de 2 cm³ de ClH₆N, et portées à l'ébullition pendant 18 heures. Après refroidissement, addition d'eau et évaporation du méthanol, il se forme un précipité blanc qu'on extrait à l'éther. La solution aqueuse, ainsi débarrassée de la partie lipidique, donne une coloration rouge en présence d'anthrone sulfurique.

Cette solution, débarrassée du méthanol, est hydrolysée à nouveau, puis neutralisée dans les conditions décrites ci-dessus. Après évaporation de l'eau sous vide, on obtient 56 mg d'un sirop légèrement coloré qui a le même R_f que l'ascarylose (R_f = 0,71). La chromatographie sur papier a été effectuée sur papier Whatmann n°1, et développée par le mélange butanol-pyridine-eau (6 : 4 : 3); le chromatogramme a été révélé d'une part par le phtalate acide d'aniline, d'autre part par le système acide périodique-benzidine.

Le pouvoir rotatoire de ce sirop non purifié est de -37° (dans le méthanol). Après distillation, il est de -33°. Le pouvoir rotatoire de l'ascarylose cristallisé, mesuré dans les mêmes conditions, est de -30°.

Nous avons pu faire cristalliser ce sirop, après l'avoir purifié par chromatographie sur colonne Chromax LKB et distillation, en amorçant la cristallisation par un cristal d'ascarylose. Après deux cristallisations dans l'acétonitrile, nous avons obtenu des aiguilles incolores d'ascarylose encore impur (F.85-88°). La faible quantité de sucre obtenue après la chromatographie (11 mg) n'a pas permis de le purifier davantage.

Diacétoxyméthyl-ascaryloside (XXVIII).

Après hydrolyse de l'ascaroside B dans les conditions décrites ci-dessus, le mélange réactionnel est filtré et le filtrat est neutralisé par du CO₃Ag₂. En procédant de la même manière que ci-dessus, on isole du méthyl-ascaryloside sous forme d'un sirop brun que l'on ne purifie pas.

250 mg de ce sirop et 250 mg d'acétate de Na fondu sont dissous dans 5 cm³ d'anhydride acétique et chauffés à reflux pendant une heure. Après refroidissement on ajoute de l'eau au mélange réactionnel et on épuise à l'éther. On isole ainsi 273 mg de produit que l'on chromatographie sur 12 g de silicate de magnésium-célite (2 : 1) (élution 36 cm³). 36 cm³ d'un mélange benzène-éther (1 : 1) éluent 101 mg d'une huile.

Par distillation sous 0,08 mm Hg à 90-100° (T. du bain d'air), on obtient une huile incolore dont le spectre IR ne montre plus de bande OH. Il s'agit du diacétoxy-méthylascaryloside (XXVIII)

$C_{11}H_{18}O_6$	Calculé	C %	53,65	H %	7,37	2 CH ₃ CO %	34,8
	Trouvé		53,69		7,40		31,88
			53,64		7,39		31,79

III - ETABLISSEMENT DE LA FORMULE BRUTE DE L'ASCARYLOSE

Dérivés cristallisés de l'ascarylose.

p,p'-nitrobiphénylsulfonylhydrazone.

25 mg d'ascarylose distillé et 45 mg de p,p'-nitrobiphénylsulfonylhydrazine sont dissous dans 0,5 cm³ d'acétonitrile. On chauffe 10 min à 80°. Un précipité se forme assez rapidement qu'on essore après 24 h et qu'on recristallise trois fois dans l'acétonitrile; on obtient ainsi une poudre micro-cristalline légèrement colorée F. 151-152°.

C ₁₈ H ₂₁ O ₇ N ₃ S	Calculé	C %	51,05	H %	5,0	N %	9,92
	Trouvé		51,11		4,84		9,72

p-toluène sulfonylhydrazone.

20 mg d'ascarylose et 38 mg de p-toluène sulfonylhydrazine sont traités de la même manière que ci-dessus. On obtient des aiguilles incolores F. 124°.

C ₁₃ H ₂₀ O ₅ N ₂ S	Calculé	C %	49,35	H %	6,37
	Trouvé		49,52		6,38

Identité des hydrolysats d'ascarosides A, B et C.

900 mg d'ascaroside A, 712 mg d'ascaroside B et 500 mg d'ascaroside C ont été hydrolysés dans les conditions décrites ci-dessus.

En procédant de la façon habituelle (voir ci-dessus), nous avons isolé respectivement 208 mg, 160 mg et 171 mg de sirop, que nous avons purifié par distillation.

Les pouvoirs rotatoires sont respectivement de -26°, -25°, -26°5 ± 2° et les analyses élémentaires ont donné les résultats suivants :

Calculé C ₆ H ₁₂ O ₄	C %	48,64	H %	8,16
Trouvé Hydrolysat A		48,60		8,30
Hydrolysat B		48,53		8,25
Hydrolysat C		48,68		8,38

Les spectres IR des trois sucres sont identiques.

Les p,p'-nitrobiphénylsulfonylhydrazones des trois hydrolysats, cristallisées deux fois dans l'acétonitrile, ont les points de fusion suivants :

Dérivé A	F. 151°-152°
Dérivé B	F. 152°-153°
Dérivé C	F. 150°

Le mélange de ces dérivés ne présente pas d'abaissement de point de fusion.

IV - ETABLISSEMENT DE LA FORMULE DEVELOPPEE DE L'ASCARYLOSE

a) Nature du groupement réducteur de l'ascarylose.

Dosage du groupe réducteur de l'ascarylose par l'hypiodite de sodium.

On introduit dans un erlenmeyer une quantité déterminée de sucre (de l'ordre de 0,7.10⁻⁴ mol.), 12 cm³ d'iode 0,02 N et 0,8 cm³ de CO₂Na₂ 5 %. Le mélange est maintenu pendant 30 min à 21° puis acidifié par 2 cm³ de SO₄H₂ 0,5 N; l'iode en excès est dosé par S₂O₃Na₂ 0,1 N.

Le dosage est effectué comparativement avec différents sucres.

	Mg de produit	Mole produit $\times 10^{-4}$	$S_2O_3Na_2O, IN$ cm^3 consommés	$\frac{\text{Mole } S_2O_3Na_2}{\text{Mole produit}}$	Théorie
Ascarylose	4,14	0,28	0,257	0,92	1
Ascarylose	4,14	0,28	0,267	0,96	1
Ascarylose	10,35	0,70	0,75	1,07	1
Ascarylose	10,35	0,70	0,76	1,08	1
Glucose	4,1	0,228	0,366	1,4	1
Rhamnose	10,6	0,65	0,78	1,2	1
Fructose	6,4	0,355	0	0	0
Fructose	18,1	1,01	0,01	0,01	0

b) Oxydation périodique.

4,14 mg d'ascarylose sont dissous dans 1 cm^3 d'eau, on y ajoute 2 cm^3 d'acide périodique 0,066 M qu'on laisse réagir pendant 20 h. On ajoute alors 2 cm^3 de bicarbonate de sodium saturé, 4 cm^3 d'acide arsénieux N/10 et 1 cm^3 d'IK à 20 %.

Au bout d'un quart d'heure d'attente, l'excès d'acide arsénieux est dosé par l'iode 0,1 N. Le dosage est effectué comparativement avec du glucose.

	Mg de produit	Mol. de produit $\times 10^{-4}$	cm^3 d'iode 0,1 N consommé	At. d'O consom- mé	O consommé par 1 mol. de sucre	Théo- rie
Ascarylose	4,14	0,28	1,21	0,605	2,15	2
Ascarylose	4,14	0,28	1,20	0,6	2,14	2
Glucose	2,9	1,61	1,53	0,77	4,8	5

Après le dosage, on chauffe le mélange réactionnel en entraînant les substances volatiles par un courant d'azote qu'on fait barboter dans une solution sulfurique de 2,4-dinitro-phénylhydrazine.

Dans le cas de l'ascarylose, on isole un précipité de 2,4-dinitro-phénylhydrazone qui fond à 153°-155° après recristallisation dans le méthanol, il n'y a pas d'abaissement du point de fusion de mélange avec la 2,4-dinitro-phénylhydrazone de l'acétaldéhyde.

Dosage d'acide formique après oxydation périodique de l'ascarylose.

L'oxydation est effectuée par 10 cm^3 d' IO_4H M/10; après 20 h de contact, l'excès d'acide périodique est détruit par quelques gouttes d'éthylène-glycol; l'acidité est dosée en présence de phénolphthaléine par la potasse 0,1 N.

	Mg de produit	Moles de produit $\times 10^{-4}$	cm^3 KOH 0,1 N con- sommés	Moles d'acide formique $\times 10^{-4}$	Moles <u>d'acide</u> Moles de sucre
Témoin	0		12,1		
Rhamnose	14,8	0,9	15,52	3,42	3,8
Ascarylose	34,8	2,35	14,93	2,83	1,24
Ascarylose	34,8	2,35	15,23	3,13	1,33

Afin de vérifier que l'acidité n'est pas due à l'acide acétique qui aurait pu se former par oxydation de l'acétaldéhyde, nous avons employé la méthode de Warner et Raptis qui permet de doser spécifiquement l'acide formique en présence d'acide acétique par distillation de l'azéotrope acide formique-chloroforme et dosage potentiométrique du distillat.

On trouve ainsi pour 1 mole d'ascarylose 1,08 et 1,11 mole d'acide formique, ce qui concorde avec les chiffres trouvés ci-dessus.

c) Ascarylitol.

Préparation de l'ascarylitol.

227 mg d'ascarylose distillé et 900 mg de NaBH_4 sont dissous dans 10 cm^3 d'eau et laissés en contact pendant 20 h à la température ordinaire. L'excès de NaBH_4 est détruit par quelques gouttes de $\text{CH}_3\text{CO}_2\text{H}$ 2 N. La solution est évaporée à sec, le résidu est ensuite repris par le méthanol et évaporé de nouveau à sec. On répète l'opération jusqu'à ce que les vapeurs de méthanol ne contiennent plus de dérivé de bore, c'est-à-dire ne colorent plus la flamme en vert (94).

Le résidu ainsi débarrassé des dérivés de bore est repris par l'acétone. Après évaporation du solvant, on obtient 182 mg (80 % de la théorie) de sirop incolore; à la chromatographie sur papier, il est révélé par l'acide periodique-benzidine, mais pas par le phtalate acide d'aniline. Après cristallisation dans l'acétone, on obtient de belles aiguilles F. $114^\circ\text{--}115^\circ$.

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4$	Calculé	C %	47,98	H %	9,40
	Trouvé		48,24		9,59

Oxydation periodique de l'ascarylitol-Dosage du formaldéhyde formé.

A 13,3 mg d'ascarylitol ($0,89 \cdot 10^{-4}$ moles) dissous dans 0,5 cm^3 d'eau, on ajoute 4 cm^3 d' IO_4H environ N/20 et on amène la solution à 5 cm^3 . Après 20 h de contact, on prélève 0,1 cm^3 de cette solution, on y ajoute 0,1 cm^3 de bisulfite de Na 36° Bé, 0,8 cm^3 d'eau et 10 cm^3 du réactif chromotropique. Le mélange est maintenu 30 min à 100° ; on opère parallèlement avec un témoin et deux échantillons de sorbitol. Les colorations obtenues étant trop intenses, on dilue les solutions cinq fois avec le réactif chromotropique.

	Mg de produit	Moles de produit $\times 10^{-4}$	$\text{Log. } \frac{I}{I_0}$
Sorbitol	2,2	0,121	0,142
Sorbitol	4,5	0,247	0,29
Ascarylitol	13,3	0,89	0,44

Dans le cas du sorbitol, les densités optiques 0,142 et 0,29 correspondent respectivement à $0,242 \cdot 10^{-4}$ moles et $0,494 \cdot 10^{-4}$ moles de formaldéhyde (valeurs théoriques). Dans le cas de l'ascarylitol, la densité optique 0,44 correspond donc à :

$$\frac{0,242 \cdot 10^{-4} \times 0,44}{0,142} = \frac{0,494 \cdot 10^{-4} \times 0,44}{0,29} = 0,75 \cdot 10^{-4} \text{ moles de formaldéhyde,}$$

c'est-à-dire 0,84 moles de formaldéhyde par mole d'ascarylitol.

d) Formule développée de l'ascarylose.

Lactone ascarylonique (XXXIV).

201 mg d'ascarylose (XXIX) dissous dans 1 cm^3 d'eau sont ajoutés à une solution de 470 mg de NO_3Ag dans 3 cm^3 d'eau. On y ajoute goutte à

goutte en refroidissant 5,5 cm³ de KOH 1 N. Le mélange est agité pendant 45 h à la température ordinaire, puis acidifié par SO₄H₂ N. On essore l'oxyde d'Ag formé et le filtrat est extrait en continu au chloroforme pendant 72 h. On obtient, après évaporation du chloroforme, 131 mg d'un sirop qui distille à 90°-110° sous 0,05 mm Hg (T. du bain d'air) et dont le spectre I.R. montre une forte bande CO à 5,69 μ.

C ₆ H ₁₀ O ₄	Calculé	C %	49,31	H %	6,90
	Trouvé		49,52		6,95

Oxydation periodique de la lactone ascarylonique.

81 mg de lactone ascarylonique distillée et 264 mg de IO₄Na (2,2 moles), sont dissous dans 10 cm³ d'eau. Après 24 h de contact, on extrait 6 fois au chloroforme. On recueille ainsi 25 mg de produit huileux que l'on chromatographie sur papier selon Löffler et Reichl (34). La révélation montre cinq taches dont une a le même R_f que l'acide malique.

Dégradation de l'ascarylitol.

1-Tritylascarylitol (XXXVII).

54 mg d'ascarylitol sec et 108 mg de chlorure de trityle sont dissous dans 0,3 cm³ de pyridine et laissés en contact pendant 20 h à la température ordinaire. Le mélange est alors extrait à l'éther après addition d'eau; l'extrait étheré est lavé de nombreuses fois à l'eau, séché sur SO₄Na₂ et évaporé à sec; les dernières traces de pyridine sont éliminées par entraînement au benzène. On recueille 130 mg de produit (92 % de la théorie) qui cristallise dans l'éther en fines aiguilles incolores F.144°-146°5.

C ₂₅ H ₂₈ O ₄	Calculé	C %	76,50	H %	7,19
	Trouvé		76,82		7,56
			76,60		7,20

Dégradation du 1-tritylascarylitol et obtention du 2-hydroxy 1,4-ditritylxybutane (XL).

91 mg de tritylascarylitol (XXXVII) et 55 mg de IO₄Na (1,1 mole) sont dissous dans 10 cm³ de dioxane aqueux à 60 % et laissés en contact pendant 20 h. Après extraction à l'éther on recueille 78 mg (97 % de la théorie) de produit amorphe (XXXVIII) qu'on dissout dans 2 cm³ de méthanol; on y ajoute 700 mg de NaBH₄ dissous dans 8 cm³ de méthanol.

Après 20 h de contact, le mélange est dilué par l'eau et extrait plusieurs fois à l'éther. L'extrait étheré est lavé à l'eau jusqu'à neutralité, séché sur SO₄Na₂ et évaporé à sec. On recueille ainsi 77 mg (98 % de la théorie) de produit amorphe (monotrityltrihydroxybutane (XXXIX)) que l'on sèche sous 0,05 mm Hg en présence de P₂O₅, pendant 10 h. A ces 77 mg dissous dans 0,2 cm³ de pyridine, on ajoute 66 mg de chlorure de trityle et on laisse en contact pendant 20 h. Après addition d'eau, on extrait à l'éther. L'extrait est lavé à l'eau de nombreuses fois, séché sur SO₄Na₂, évaporé à sec; les dernières traces de pyridine sont chassées par évaporation prolongée sous vide et entraînement au benzène. On recueille finalement 127 mg (93 % de la théorie) de produit (hydroxyditritylxybutane XL) qui cristallise dans l'éther en fines aiguilles F.178°-180° [α]_D = -4° (c = 0,92 benzène).

C ₄₂ H ₃₈ O ₃	Calculé	C %	85,39	H %	6,48
	Trouvé		85,37		6,76

Synthèse du L-2 hydroxy 1,4 ditritylxybutane (XLIII).

3,2 g d'acide L-malique (XLI) sont dissous dans 50 cm³ de dioxane.

On y ajoute par petites portions 7,2 g d' AlLiH_4 et 70 cm^3 de dioxane. Le mélange est chauffé à 60° pendant 5 h avec agitation magnétique, puis laissé à la température ordinaire pendant 20 h. Après destruction de l'excès d' AlLiH_4 par l'eau glacée, on concentre la solution sous pression réduite; le précipité d'alumine est séparé par centrifugation; la solution est passée sur une colonne d'amberlite MB₃ et évaporée à sec. Le résidu contenant encore des sels est extrait au butanol. Après évaporation du butanol, on distille le résidu à 80°-120° sous 0,03 mm Hg : on obtient ainsi 535 mg de sirop (trihydroxybutane (XLII) $[\alpha]_D = -22^\circ$ (méthanol, c = 1).

500 mg de ce sirop et 2,86 g de chlorure de trityle (2,2 moles) sont dissous dans 5 cm^3 de pyridine et traités de la manière habituelle. On recueille 3,011 g de produit qu'on cristallise deux fois dans l'éther. On obtient de fines aiguilles F. 176°-178° $[\alpha]_D = +4^\circ$ (c = 6,07 benzène).

$\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{O}_3$	Calculé	C %	85,39	H %	6,48
	Trouvé		85,70		6,65
			85,95		6,63

2-Hydroxy-1,4-ditrityl oxy butane racémique (XL bis)

2 g d'acide malique racémique sont traités comme ci-dessus. On obtient 513 mg de produit distillé (trihydroxybutane). 421 mg de trihydroxybutane redistillé sont tritylés de la manière habituelle. Après isolement, on recueille 2,3 g de produit qui cristallise dans l'éther F. 166°-168°.

$\text{C}_{42}\text{H}_{38}\text{O}_3$	Calculé	C %	85,39	H %	6,48
	Trouvé		85,63		6,63

CHAPITRE VII

SYNTHÈSE DE TROIS 3, 6-DIDÉSOXY-HEXOSES

I - SYNTHÈSE DU 3,6-DIDÉSOXY D-ARABINO-HEXOSE

3-désoxy D-mannoside de méthyle (LIII).

5,9 g de 4,6-benzylidène 3-désoxy D-mannoside de méthyle (LII) sont hydrolysés par 5 g de chlorhydrate de p-nitrophényl-hydrazine selon (65). On isole ainsi 3,8 g d'un sirop qui cristallise dans l'acétone en donnant 940 mg de cristaux incolores, $F = 120-124^\circ$. Par chromatographie des eaux-mères sur poudre de cellulose on obtient une quantité supplémentaire de 3-désoxy D-mannoside de méthyle.

6-tosyl 3-désoxy D-mannoside de méthyle (LIV)

940 mg de 3-désoxy D-mannoside de méthyle (LIII), séchés pendant 4 h à 60° sous 0,1 mm Hg, sont dissous dans 15 cm³ de pyridine. On y ajoute 991 mg de chlorure de tosyloxy et on laisse réagir pendant 24 h. Après addition d'eau, on extrait au chloroforme. L'extrait chloroformique est lavé à l'acide et à l'eau, séché sur SO₄Na₂ et évaporé à sec. On obtient 993 mg de produit que l'on chromatographie sur 55 g de silicate de Mg-celite (2 : 1), (élutions de 150 cm³). 284 mg de produit sont élués par 600 cm³ d'éther et 600 mg par 450 cm³ d'un mélange éther-méthanol (95 : 5). Les analyses (S) et (OCH₃) et cette dernière fraction concordent avec celles d'un 6-tosyl mannoside de méthyle.

C ₁₄ H ₂₀ O ₇ S	Calculé	S %	9,65	OCH ₃ %	4,52
	Trouvé		8,97		4,23

3,6-didésoxy D-arabino-hexose (LV-XLIV).

609 mg de 6-tosyl 3-désoxy D-mannoside de méthyle (LIV) sont dissous dans 16 cm³ d'un mélange benzène-éther (1 : 1). On y ajoute 500 mg de LiAlH₄ et on porte à l'ébullition pendant 18 h. Après refroidissement, le mélange est versé sur de la glace et neutralisé par SO₄H₂. On évapore à sec et on extrait le résidu au chloroforme bouillant. Après évaporation du chloroforme, on obtient 227 mg de sirop qui sont hydrolysés par 100 cm³ de ClH 0,06 N à l'ébullition pendant 2 h. Le mélange réactionnel est neutralisé par du carbonate d'argent dont l'excès est précipité par SH₂. Après filtration et évaporation du filtrat, on obtient 168 mg de sirop ($R_{\text{RH}} = 1,29$), qui distille sous 0,05 mm à 125-135° (T. du bain d'air).

On recueille 137 mg de distillat : $[\alpha]_D = +23^\circ \pm 2^\circ$ ($c = 2,74$, dans l'eau). Le sirop ainsi obtenu a cristallisé spontanément; après recristallisation dans l'acétonitrile, nous avons obtenu des aiguilles incolores $F = 97-99^\circ$.

$C_6H_{12}O_4$	Calculé	C %	48,64	H %	8,16
	Trouvé		48,54		8,40

3,6-didésoxy D-arabino-hexitol (LVI).

108 mg de 3,6-didésoxy D-arabino-hexose sont dissous dans 1 cm³ d'eau. On y ajoute 100 mg de NaBH₄ dissous dans 4 cm³ d'eau. On laisse réagir pendant 15 h. L'excès de NaBH₄ est détruit par quelques gouttes de CH₃CO₂H 2 N. La solution est évaporée à sec, le résidu est ensuite repris par le méthanol et évaporé de nouveau à sec. On répète l'opération jusqu'à ce que les vapeurs de méthanol ne contiennent plus de dérivé de bore, c'est-à-dire ne colorent plus la flamme en vert (94). Le résidu est ensuite extrait plusieurs fois à l'acétone bouillante. On recueille ainsi 104 mg de produit. Après cristallisation dans l'acétone, on obtient des aiguilles incolores, $F = 113 - 115^\circ$ $[\alpha]_D = -35^\circ$ ($c = 0,738$ dans l'eau) $R_{RH} = 1,07$. On n'observe pas d'abaissement de point de fusion de mélange avec l'ascarylitol et les spectres IR des deux substances sont identiques.

$C_6H_{14}O_4$	Calculé	C %	47,98	H %	9,40
	Trouvé		48,11		9,06

II - SYNTHÈSE DU 3,6-DIDÉSOXY D-RIBO-HEXOSE

3-désoxy D-glucoside de méthyle (LVIII).

2 g de 3-désoxy D-glucose (LVI) sont dissous dans 20 cm³ de méthanol absolu contenant 1,5 % de ClH. On fait bouillir pendant 3 h, puis la solution est neutralisée par CO₃Ag₂. Après filtration, les sels d'Ag restant en solution sont précipités par SH₂. On évapore à sec, on reprend le résidu par l'acétone et on obtient ainsi 2,165 g de sirop soluble dans l'acétone : $Eb_{0,02} = 150 - 180^\circ$ (T. du bain d'air).

$C_7H_{14}O_5$	Calculé	C %	47,18	H %	7,92
	Trouvé		47,10		8,03

6-tosyl 3-désoxy D-glucoside de méthyle (LIX).

1,98 g de 3-désoxy D-glucoside de méthyle (LVIII) sont dissous dans 20 cm³ de pyridine et additionnés de 2 g de chlorure de tosyloxy ; on laisse le mélange 48 h à la température ambiante. On traite le mélange réactionnel comme il est décrit ci-dessus et on obtient ainsi 2,97 g de produit qu'on chromatographie sur 135 g de silicate de Mg-célite (2 : 1) (élutions : 400 cm³). 2,57 g de dérivé monotosylé sont élués par 1 200 cm³ de chloroforme contenant de 1 à 10 % de méthanol.

3,6-didésoxy D-ribo-hexose (LXI).

Les 2,57 g obtenus ci-dessus sont dissous dans 70 cm³ d'un mélange de benzène-éther (1 : 1). On y ajoute 2,5 g de LiAlH₄ et on fait bouillir pendant 20 h. Après refroidissement, le mélange réactionnel est traité comme précédemment. On obtient 1,13 g de sirop qu'on hydrolyse par 50 cm³ de ClH 0,1 N à l'ébullition pendant 3 h. Après neutralisation par CO₃Ag₂ et en procédant de la manière habituelle, on obtient 789 mg de sirop réducteur (76 % de la théorie) que l'on chromatographie sur une colonne de poudre de cellulose Whatmann (diamètre 3 cm, hauteur 33 cm). On élue avec l'acétone contenant 5 % d'eau ; 40 fractions de 20 cm³ sont recueillies. Les éluats 7 à 11 contiennent 375 mg de produit ayant un $R_{RH} = 1,25$ et distillant sous 0,05 mm Hg entre 125 et 150° (T. du bain d'air), $[\alpha]_D = +10^\circ$ ($c = 0,94$ dans l'eau).

C ₆ H ₁₂ O ₄	Calculé	C %	48,64	H %	8,16
	Trouvé		48,68		8,23

3,6-didésoxy D-ribo-hexitol (LXII).

124 mg de 3,6-didésoxy D-ribo-hexose (LXI) sont dissous dans 10 cm³ d'eau et additionnés de 124 mg de NaBH₄. Après une nuit de contact, on extrait de la façon habituelle et on obtient 72 mg de sirop, que l'on chromatographie sur poudre de cellulose. Après distillation (Eb_{0,05} = 130-170°, T. du bain d'air), le produit cristallise dans l'acétone : F = 67-68.5°, [α]₀ = -17° (c = 0,94 dans l'eau).

C ₆ H ₁₄ O ₄	Calculé	C %	47,98	H %	9,40
	Trouvé		47,93		9,68

III - SYNTHÈSE DU 3,6-DIDÉSOXY L-LYXO-HEXOSE

2,3-isopropylidène L-rhamnoside de méthyle (LXV).

8,8 g de L-rhamnose sec sont méthylés selon (95). On obtient après distillation (Eb_{0,08} = 150° T. du bain d'air) 8,7 g de L-rhamnoside de méthyle (LXIV) que l'on condense avec l'acétone en présence de SO₄H₂ et SO₄Cu selon (95). On sépare par distillation le 2,3-isopropylidène L-rhamnoside de méthyle (LXV) (Eb_{0,01} = 80-83°) du rhamnoside de méthyle n'ayant pas réagi ; on obtient ainsi 4 g de sirop n_D²⁰ = 1,458, [α]₀ = -9° (95). On recommence l'opération sur le rhamnoside de méthyle récupéré et on obtient de la même façon 1,9 g de sirop : Eb_{0,01} = 80-83° n_D¹⁸ = 1,458.

4-tosyl 2,3-isopropylidène L-rhamnoside de méthyle (LXVI).

A partir de 4 g d'isopropylidène rhamnoside de méthyle (LXV) et de 6,4 g de chlorure de tosyloxy, on obtient en procédant selon (95), 6 g de produit, contenant du soufre, que l'on chromatographie sur 180 g d'alumine (élutions 500 cm³). 2 l. d'un mélange d'éther de pétrole-benzène (1 : 1), 1 l. de benzène et 500 cm³ de mélange benzène-éther (9 : 1) éluent respectivement 1,82, 1,18 et 1,18 g de produit. Chaque fraction cristallise dans l'éther de pétrole en donnant des aiguilles incolores, F = 61-63°, [α]₀ = +23° (c = 3,94 dans le méthanol (67-95).

4-tosyl L-rhamnoside de méthyle (LXVII).

1,7 g de 4-tosyl 2,3-isopropylidène L-rhamnoside de méthyle sont hydrolysés selon (67). On obtient 1,5 g de sirop n_D¹⁸ = 1,525, [α]₀ = -80° (c = 1,79 dans CHCl₃).

3,4-anhydro L-rhamnoside de méthyle (LXVIII).

2,7 g de 4-tosyl rhamnoside de méthyle (LXVII) sont neutralisés par la soude 2 N selon (64). On obtient, après cristallisation dans l'éther de pétrole, 905 mg de belles aiguilles incolores F = 60-63°... 68° [α]₀ = -16° (c = 0,932 dans l'eau).

3,6-didésoxy L-lyxo-hexose (LXIX = LI).

905 mg de 3,4-anhydro L-rhamnoside de méthyle sont réduits par 900 mg de LiAlH₄ selon (64). On isole de la manière habituelle 783 mg de sirop que l'on hydrolyse pendant 3 h par ClH 0,06 N à l'ébullition. Après le traitement habituel par du CO₂Ag₂ et du SH₂, on obtient 635 mg de sirop réducteur que l'on chromatographie sur colonne de poudre de cellulose Whatmann (hauteur 20 cm, diamètre 28 mm). On élue par un mélange d'acétone conte-

nant 5 % d'eau ; 115 cm³ (10 éluutions) permettent de recueillir 55 mg de sirop distillant sous 0,05 mm Hg à 125-150° (T. du bain d'air). $R_{\text{RH}} = 1,29$, $[\alpha]_D = -20^\circ$ (c = 1,4 dans le méthanol)

$\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_4$	Calculé	C %	48,64	H %	8,16
	Trouvé		48,87		8,34

p,p'-nitro biphénylsulfonylhydrazone.

39 mg de 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose, dissous dans 0,5 cm³ d'acétonitrile et additionnés de 82 mg de *p,p'*-nitrobiphényl-sulfonyl-hydrazine sont maintenus à 80° pendant 20 mn puis à 0° pendant 12 h (6). Les cristaux formés sont essorés et cristallisés deux fois dans l'acétonitrile. L'hydrazone ainsi obtenue fond à 143,4-145°.

$\text{C}_{18}\text{H}_{21}\text{N}_3\text{O}_7\text{S}$	Calculé	C %	51,05	H %	5,00
	Trouvé		50,85		5,56

Oxydation periodique du 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose.

Le 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose et le rhamnose pris comme témoin, dissous dans 2 cm³ d'eau, sont additionnés de 5 cm³ d' IO_4H 0,66 M. Après une nuit de contact, on ajoute 20 cm³ de CO_2HNa saturé, 10 cm³ d' As_2O_3 0,1 N, et 2 cm³ d'IK à 20 %. On titre l'excès d'anhydride arsénieux par l'iode 0,1 N.

	mg de produit	mol. de produit	cm ³ d' I_2 0,1 N consommés	atomes d'O consommés	atomes d'O par mol. de produit	Théorie
Rhamnose	17,7	$0,97 \cdot 10^{-4}$	7,22	$3,61 \cdot 10^{-4}$	3,7	4
3,6-didésoxy <i>lyxo</i> -hexose	14,2	$0,96 \cdot 10^{-4}$	3,67	$1,84 \cdot 10^{-4}$	1,92	2
3,6-didésoxy <i>lyxo</i> -hexose	14,2	$0,96 \cdot 10^{-4}$	3,75	$1,87 \cdot 10^{-4}$	1,95	2

Pour la recherche des produits volatils, 17,3 mg de 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose ($1,17 \cdot 10^{-4}$ mol.) sont oxydés de la même façon, l'excès d' IO_4H est neutralisé par As_2O_3 . Les produits volatils du mélange réactionnel sont entraînés à 70° par un courant d'azote dans une solution aqueuse de sulfate de 2,4-dinitro-phénylhydrazine. On recueille ainsi 17 mg de dinitro-phénylhydrazone (65 % de la théorie). La chromatographie sur papier selon (25) montre qu'il s'agit de la dinitro-phénylhydrazone de l'acétaldéhyde qui, cristallisée dans le méthanol, fond à 155-160° et ne présente pas d'abaissement du point de fusion de mélange avec le dérivé authentique. Aucun autre produit volatil n'a pu être isolé, même après entraînement à la vapeur d'eau.

3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexitol (LXX).

71 mg de 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose sont réduits par 80 mg de NaBH_4 et traités de la façon habituelle. On recueille 58 mg de produit, $R_{\text{RH}} = 1,12$, que l'on chromatographie sur colonne de cellulose Whatmann (hauteur 20 cm, diamètre 2 cm). On élue par l'acétone contenant 5 % d'eau. On recueille 13 éluats de 9 cm³. Les fractions 9 à 13 contiennent 45 mg de produit qui cristallise dans l'acétone après distillation ($\text{Eb}_{0,05} = 130-150^\circ$, T. du bain d'air). Après deux cristallisations, on obtient des aiguilles incolores : F = 75-77°, $[\alpha]_D = -11^\circ$ (c = 0,684) dans le méthanol.

$\text{C}_6\text{H}_{14}\text{O}_4$	Calculé	C %	47,98	H %	9,40
			47,63		9,20

CHAPITRE VIII

FORMULES DÉVELOPPÉES DES TROIS ASCAROSIDES

MODE DE LIAISON ENTRE LES AGLYCONES ET L'ASCARYLOSE DANS LES ASCAROSIDES

Dosage du groupe réducteur dans les ascarosides.

Les ascarosides étant insolubles dans l'eau, le dosage a été effectué en milieu hétérogène, comparativement avec le monopalmitate de glucose (groupe réducteur libre) et le monopalmitate glucoside de méthyle ; le dosage du groupe réducteur dans le monopalmitate de glucose montre que l'hétérogénéité du milieu n'empêche pas l'oxydation d'avoir lieu.

Les produits sont dissous dans 2 cm³ de dioxane ; on y ajoute 3 cm³ d'iode 0,1 N, 1 cm³ de CO₃Na₂ 5 %, et on chauffe à 40° pendant 1 h 30 ; puis on acidifie avec 2,5 cm³ de SO₄H₂ 1 N et on titre l'iode ainsi libérée, comparativement avec un témoin, par S₂O₃Na₂ 0,1 N.

	mg de produit	cm ³ d'iode 0,1 N consommés	Théorie *
Monopalmitate de glucose	24	0,59	0,58
Monopalmitate glucoside de méthyle	21,4	0	0,495
Ascaroside A	26,0	0,04	0,48
	16,1	0,02	0,298
Ascaroside B	27,2	0,08	0,45
	22,0	0,08	0,37
Ascaroside C	17,5	0,01	0,24

* en cm³ d'iode 0,1 N que consommerait un groupement réducteur libre dans la molécule de produit dosé.

RÉSUMÉ

Au cours de notre travail, nous avons montré que l'"alcool ascarylique", constituant principal des lipides insaponifiables de *Parascaris equorum*, est un mélange de trois glycolipides, que nous appelons ascarosides A, B et C. Ce sont des produits caractéristiques du métabolisme de l'oocyte et de l'œuf d'ascaris.

Nous nous sommes fixé le but d'élucider leur constitution chimique, ce qui présentait un certain intérêt, tant au point de vue de la biochimie des Ascaris qu'au point de vue de la chimie des substances naturelles en général.

Nous avons montré que les ascarosides A, B et C, dont les formules brutes sont respectivement $C_{34}H_{68}O_4^*$, $C_{37}H_{74}O_5$ et $C_{43}H_{84}O_8$, sont des glycosides d'un même sucre, l'ascarylose.

Nous avons déterminé d'une part la structure des trois aglycones, d'autre part la structure de l'ascarylose, ce qui nous a permis d'élucider la constitution chimique des trois ascarosides.

Nous avons établi que l'ascarylose est un 3,6-didésoxy-aldo-hexose, $C_6H_{12}O_4$. Quatre autres 3,6-didésoxy-aldo-hexoses ont été isolés, à la même époque, à partir de bactéries gram-négatives, par Westphal, Lüderitz et coll. L'ascarylose et ses quatre isomères sont les premiers 3-désoxysucres trouvés dans la nature.

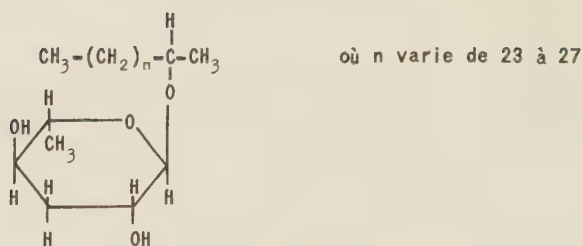
Les 3,6-didésoxy-hexoses constituent une nouvelle classe de sucres naturels, dont nous avons pu élucider la stéréochimie, en collaboration avec Westphal, Lüderitz et coll.

La détermination de la structure de ces nouveaux sucres présentait d'autant plus d'intérêt que les isomères de l'ascarylose jouent un rôle important dans la spécificité immunologique des endotoxines de bactéries dont ils sont extraits.

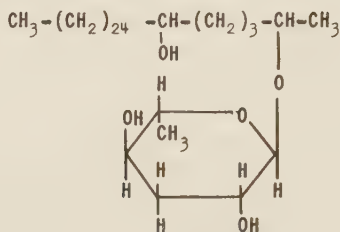
Nous résumerons ici les principales étapes qui nous ont conduite à l'établissement de la structure des ascarosides A, B et C, dont les formules développées sont les suivantes :

* L'ascaroside A est un mélange de glycolipides homologues, cette formule étant une formule moyenne.

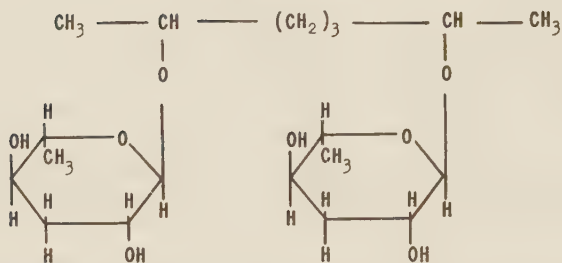
ASCAROSIDE A



ASCAROSIDE B



ASCAROSIDE C



1) ASCAROSIDE A ($\text{C}_{34}\text{H}_{68}\text{O}_4$)*. L'ascaroside A ne se trouve qu'en proportion de 20 % dans le mélange des trois ascarosides.

- la présence de deux fonctions alcool dans l'ascaroside A a été prouvée par la préparation d'un diacétate.

- l'hydrolyse acide de l'ascaroside A fournit une molécule d'ascarylose et une molécule d'aglycone A. Celui-ci est un mono-alcool secondaire.

- la position de la fonction alcool sur le carbone 2 de l'aglycone A a été établie par l'ozonisation du carbure insaturé obtenu par déshydratation de celui-ci.

L'étude du spectre de masse de l'aglycone A confirme la position de la fonction alcool, et montre qu'il s'agit d'un mélange de méthylcarbinols homologues, $\text{C}_{26}\text{H}_{54}\text{O}$ à $\text{C}_{30}\text{H}_{62}\text{O}$.

2) ASCAROSIDE B ($\text{C}_{37}\text{H}_{74}\text{O}_5$). L'ascaroside B (67 % du mélange) possède trois fonctions alcool, que nous avons mises en évidence par la préparation d'un triacétate et d'un triméthyléther. Par hydrolyse acide, on obtient une molécule d'ascarylose et une molécule d'aglycone.

* Voir note page précédente.

Aglycone B - L'aglycone B est un dialcool secondaire, $C_{31}H_{64}O_2$, dont nous avons préparé les dérivés diacétylés et diméthylés. Son oxydation conduit à une dicétone $C_{31}H_{60}O_2$.

- Nous avons déterminé la longueur de la chaîne carbonée de l'aglycone B de la façon suivante : nous avons d'abord éliminé les fonctions oxygénées en réduisant la dicétone $C_{31}H_{60}O_2$ selon la méthode de Huang-Minlon. L'hydrocarbure obtenu a été identifié à la paraffine $C_{31}H_{64}$ par la comparaison de son diagramme de diffraction des rayons X avec ceux des paraffines $C_{31}H_{64}$ et $C_{32}H_{66}$, que nous avons synthétisés.

- La déshydratation de l'aglycone B, suivie de l'ozonisation du carbure insaturé obtenu, ont permis de situer les fonctions alcool sur le carbone 2 et sur le carbone 6.

- La position relative de ces deux fonctions a été confirmée par l'étude des produits d'oxydation de la dicétone $C_{31}H_{60}O_2$.

- L'ensemble de ces résultats prouve que l'aglycone B est le 2,6-dihydroxy-hentriacontane.

- L'étude de l'hydrolyse acide du triméthyl-O-ascarioside B permet de conclure que, dans l'ascarioside B, l'ascarylose est lié à la fonction alcool située sur le carbone 2 de l'aglycone.

3) ASCARIOSIDE C. ($C_{43}H_{88}O_8$). L'ascarioside C (13 % du mélange) possède trois fonctions alcool, mises en évidence par la préparation d'un tétracétate et d'un tétraméthyléther.

- Par hydrolyse acide, on obtient deux molécules d'ascarylose et une molécule d'aglycone ; ce dernier s'est avéré être identique à l'aglycone B.

- L'étude de l'hydrolyse acide du tétraméthyl-O-ascarioside montre que les deux fonctions alcool de l'aglycone C (2,6-dihydroxy-hentriacontane) sont liées chacune à une mole d'ascarylose.

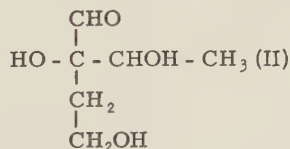
4) ASCARYLOSE. La formule brute de l'ascarylose, $C_6H_{12}O_4$, a été déduite des analyses élémentaires du sucre et de deux dérivés cristallisés : les p, p'-nitrobiphényl- et p-toluène-sulfonyl-hydrazones.

- Nous avons prouvé que l'ascarylose est un aldose.

- L'oxydation périodique montre qu'il contient deux groupements α -glycols (ou un α -glycol et un α -hydroxyaldéhyde), et un groupement $CH_3-CHOH-\underset{\substack{| \\ \downarrow}}{COH}$.

- L'étude de l'oxydation périodique de l'ascarylitol (hexitol obtenu par réduction de l'ascarylose) montre que l'ascarylose n'est pas un 2,6-didésoxy-hexose.

- L'ensemble de ces résultats permet de déduire qu'il existe un groupement CH_2 en β du groupe réducteur. Deux formules sont alors possibles, les formules I et II.

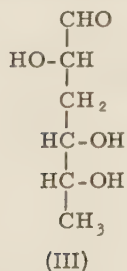


- Nous avons pu prouver que l'ascarylose a la formule I en ef-

fectuant la dégradation de l'ascarylitol et celle de la lactone ascarylonique.

5) La stéréochimie de l'ascarylose a été établie par la synthèse de son antipode optique.

- Nous avons synthétisé le 3,6-didésoxy D-*arabino*-hexose (III). Nous avons montré qu'il est identique au sucre bactérien, le tyvelose, et qu'il est l'antipode optique de l'ascarylose. Celui-ci est donc le 3,6-didésoxy L-*arabino*-hexose (IV)



(III)

(IV)

(V)

(VI)

- La synthèse du 3,6-didésoxy D-*ribo*-hexose (V) a permis d'identifier le paratose, isomère de l'ascarylose.

- Nous avons également synthétisé le 3,6-didésoxy L-*lyxo*-hexose (VI) qui n'a pas été trouvé jusqu'ici dans la nature.

6) La configuration α -L des ascarosides a été établie par l'examen des différences de rotation moléculaire des ascarosides, de leurs aglycones et de l'ascarylose.

BIBLIOGRAPHIE

- (1) F. FLURY - Zur chemie und Toxikologie der Ascariden. Arch. Exp. Path. Pharmacol. 1912, 67, 275.
- (2) E. FAURE-FREMIET - a) Le cycle germinatif chez l'"*Ascaris megalocephala*", Arch. Anat. Microscop. 1913, 15, 435. b) La formation de la membrane interne de l'œuf d'*Ascaris megalocephala*, C.R. Soc. Biol. 1913, 74, 1183.
- (3) F.N. SCHULZ et M. BECKER - Über ascarylalcohol. Bioch. Z. 1933, 265, 253.
- (4) G. PON et A.M. STAUB - Etude chimique du polyoside somatique typhique. Bull. Soc. Chim. biol. 1952, 34, 1132.
- (5) O. WESTPHAL - Bakterienreizstoffe und ihre Wirkungsweise. Angew. Chem. 1952, 64, 314.
- (6) O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, I. FROMME et N. JOSEPH - Neue Desoxyzucker als Bausteine von Polysaccharid - Symplexen gram-negativer Bakterien. Tyvelose und Abequose. Angew. Chem. 1953, 65, 555.
- (7) D.A.L. DAVIES, A.M. STAUB, I. FROMME, O. LÜDERITZ et O. WESTPHAL - Contribution of deoxymethylpentoses to the serological specificity of some bacterial polysaccharides, and the recognition of a new sugar, paratose - Nature 1958, 181, 822.
- (8) O. LÜDERITZ, A.M. STAUB, S. STIRM et O. WESTPHAL - Colitose (3-Desoxy-L-fucose), ein neuer Zuckerbaustein, mit immunspezifischer Funktion in Endotoxinen (Lipopolysacchariden) einiger gram-negativer Bakterien. Bioch. Z. 1958, 330, 193.
- (9) V. MOYLE et E. BALDWIN - Volatile fatty acids of *Ascaris lumbricoides* from the pig. Bioch. J. 1952, 51, 504.
- (10) E. BUEDING et H.W. YALE - Production of α -methylbutyric acid by bacteria-free *Ascaris lumbricoides* J. Biol. Chem. 1951, 193, 411.
- (11) E. BUEDING - Formation of tiglic and n-valeric acids by bacteria-free *Ascaris lumbricoides* J. Biol. Chem. 1953, 202, 505.
- (12) D. FAIRBAIRN - a) Lipids of the female reproductive organs in *Ascaris lumbricoides*- Can. J. Biochem. Physiol. 1955, 33, 31. b) Embryonic and post-embryonic changes in the lipids of *Ascaris lumbricoides* eggs. Can. J. Biochem. Physiol. 1955, 33, 122. c) The muscle and integument lipids in female *Ascaris lumbricoides* - Can. J. Biochem. Physiol. 1956, 34, 39.
- (13) H.J. SAZ et A. WEIL - The mechanism of the formation of α -methylbutyrate from carbohydrate by *Ascaris lumbricoides* muscle. J. Biol. Chem. 1960, 235, 914.
- (14) D. FAIRBAIRN et B.I. PASSEY - Lipid components in the vitelline membrane of *Ascaris lumbricoides* eggs, Can. J. Biochem. Physiol. 1955, 33, 130.
- (15) T. von BRAND et M.I. WINKELJOHN - Observations on the ether extract of *Ascaris* males and *Eustrongylides* larvae, Proc. Holminthol. Soc. Wash - D.C. 1945, 12, 62.

- (16) D. FAIRBAIRN et R. N. JONES - Cholesterol from *Ascaris lumbricoïdes* (Nematoda) Can. J. Biochem. Physiol. 1956, 34, 182.
- (17) H. C. JENNINGS - The biological characterization of a serologically active lipid fraction of the nematode *Haemoncus contortus* - Australian J. Sci. Research, 1949, 32, 408.
- (18) J. MASQUELIER et J. BAILENGER - Rôle des bactéries dans l'apparition des propriétés hémolytiques des extraits d'*Ascaris* C.R. Soc. Biol. 1949, 143, 1183.
- (19) D. FAIRBAIRN - The biochemistry of *Ascaris*. Exptl. Parasitology 1957, 6, 491.
- (20) R. W. TIMM - Chemical composition of the vitelline membrane of *Ascaris lumbricoïdes* var *suis*. Science 1950, 112, 167.
- (21) S. M. PARTRIDGE - Aniline hydrogen phthalate as a spraying reagent for chromatography of sugars. Nature, 1949, 164, 443.
- (22) J. A. CIFONELLI et F. SMITH - Detection of glycosides and other carbohydrate compounds on paper chromatograms, Anal. Chem. 1954, 26, 1132.
- (23) H. T. GORDON, W. THORNBURG et L. N. WERUM - Rapid paper chromatography of carbohydrates and related compounds. Anal. Chem. 1956, 28, 849.
- (24) L. RUTTER - Modified technique in filter-paper chromatography-Nature 1948, 161, 435.
- (25) L. HORNER et W. KIRMSE. - Zur oxydativen Entalkylierung gemischt substituierter tertiärer Amine durch Dibenzoylperoxyd, Liebigs Ann. 1953, 597, 48.
- (26) K. FINK et R. M. FINK - Application of filter paper partition chromatography to qualitative analysis of volatile and non volatile organic acids. Proc. Soc. Exptl. Biol. Med. 1949, 70, 654.
- (27) E. R. HISCOX et N. J. BERRIDGE - Use of paper partition chromatography in the identification of the volatile fatty acids-Nature 1950, 166, 522.
B. LINDQVIST et T. STORGARDS - Paper chromatographic separation of volatile fatty acids. A study of a number of factors involved. Acta Chem. Scand. 1953, 7, 87.
- (28) P. FLEURY et J. LANGE - Etude de l'action de l'acide périodique sur les composés polyhydroxylés. 1ère partie - Techniques utilisées. J. Pharm. Chim. 1933, 17, 196. 2ème partie - Action de l'acide périodique sur les acides alcools - Ibid. p. 313. 3ème partie - Action de l'acide périodique sur les sucres (oses), Ibid. p. 409.
H. HERISSEY, P. FLEURY et M. JOLY - Action comparée de l'acide périodique sur quelques hexoses et sur des hétérosides artificiels qui en dérivent. J. Pharm. Chim. 1934, 20, 149.
- (29) J. POLONSKY, C. FOUQUEY, G. FERREOL et E. LEDERER - Sur la structure chimique de l'"alcool ascarylique" - C.R. Acad. Sc. 1955, 240, 2265.
- (30) C. FOUQUEY, J. POLONSKY et E. LEDERER - Sur la structure chimique de l'"alcool ascarylique", isolé de *Parascaris equorum*. Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, 101.

- (31) R. JOHANSON - Anthrone in the estimation of hexose sugars, with special reference to pentose interference. Anal. Chem. 1954, 26, 1331.
 - (32) HUANG-MINLON - A simple modification of the Wolff - Kishner reduction J. Am. Chem. Soc. 1946, 68, 2487.
 - (33) D.F. MEIGH - Separation of the 2,4-dinitrophenylhydrazone of volatile aldehydes and ketenes by paper chromatography. Nature, 1952, 170, 579.
 - (34) J.E. LÖFFLER et E.R. REICHL - Eine Methode zum Nachweis und zur Bestimmung organischer Säuren in Papier chromatogrammen. Mikrochim. Acta, 1953, 79.
 - (35) J. BICKEL, H. SCHMID et P. KARRER - Zur kenntnis des Fluorocurins und Mavacurins. Helv. chim. Acta, 1955, 38, 649 (voir p.653 et 664).
 - (36) J. POLONSKY et E. LEDERER - Synthèses de quelques acides mycoliques, Bull. Soc. Chim. France, 1954, 504.
 - (37) R.C. FUSON et C.W. TULLOCK - The haloform reaction - XIV - An improved iodoform test. J. Am Chem. Soc. 1934, 56, 1638.
 - (38) L.C. KING - The reaction of iodine with some ketones in the presence of pyridine - J. Am. Chem. Soc. 1944, 66, 894.
 - (39) J.F. GROVE et H.A. WILLIS - Infrared spectroscopy and structural chemistry. Part. I - Keto - lactol tautomerism, J. Chem. soc. 1951, 877.
 - (40) M. IKAWA et C. NIEMANN - A spectrophotometric study of the behavior of carbohydrates in seventy-nine per cent sulfuric acid. J. Biol. Chem. 1949, 180, 923.
 - (41) L.H. KOEHLER - Reaction of deoxy sugars with anthrone. Anal. Chem. 1954, 26, 1914.
 - (42) S.M. PARTRIDGE et R.G. WESTALL - Filter-paper partition chromatography of sugars, Biochem. J. 1948, 42, 238.
 - (43) O. WESTPHAL, H. FEIER, O. LÜDERITZ et I. FROMME. - Die Umsetzung und Charakterisierung von Zuckern mit Sulfonylhydrazides. Biochem. Z. 1954, 326, 139.
 - (44) M. MACLEOD et R. ROBISON - The application of the iodimetric method to the estimation of small amounts of aldoses. Biochem. J. 1929, 23, 517.
 - (45) P. FLEURY - Quelques aspects non classiques de l'action oxydante de l'acide periodique sur les composés organiques. Bull. Soc. Chim. France, 1955, 1126.
 - (46) B.R. WARNER et L.Z. RAPTIS - Determination of formic acid in presence of acetic acid. Anal. Chem. 1955, 27, 1783.
 - (47) J. VON EUW et T. REICHSTEIN - Die Glycoside der Samen von *Strophanthus Nicholsonii* Holm. Glycoside und Aglycone. Helv. Chim. Acta. 1948, 31, 883.
 - (48) Z. DISCHE - Über einige neue charakteristische Farbreaktionen der Thymonukleinsäure und eine Mikromethode zur Bestimmung derselben in tierischen organen mit Hilfe dieser Reaktionen - Mikrochemie, 1930, 4 (p. 9).
- R.E. DERIAZ, M. STACEY, E.G. TEECE et L.F. WIGGINS - Deoxy

sugars Part. I - The Dische reaction for 2-deoxypentoses. J. Chem. Soc. 1949, 1222.

- (49) J. MITCHELL Jr. - Determination of carbonyl compounds - Chromotropic acid reagent for formaldehyde. Organic analysis, New York, 1953, p. 287.
- (50) J. CARLES, A. SCHNEIDER et A.M. LACOSTE - Contribution à l'étude chromatographique des principaux acides organiques. Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 221.
- (51) C. FOUQUEY, J. POLONSKY et E. LEDERER - Structure chimique de l'"ascarylose". Bull. Soc. Chim. Biol. 1958, 40, 315.
- (52) J.M. WEBB et H.B. LEVY - A sensitive method for the determination of deoxyribonucleic acid in tissues and microorganisms. J. Biol. Chem. 1955, 213, 107.
- (53) I. FROMME, O. LÜDERITZ, H. STIERLIN et O. WESTPHAL - Ein Nachweisverfahren für 3-Desoxy-aldohexosen - Biochem. Z. 1958, 330, 53.
- (54) I. FROMME, K. HIMMELSPACH, O. LÜDERITZ et O. WESTPHAL - Analyse der Zuckerbausteine in bakteriellen Lipopolysacchariden - Abequose und Tyvelose als 3,6-Bisdesoxy-aldo-hexosen. Angew. Chem. 1957, 69, 643.
- (55) A.P. MAC LENNAN et D.A.L. DAVIES - Aldoheptoses and other novel sugars produced by bacteria. Colloque international sur la biochimie des glucides - Paris - Juillet 1960 - Bull. Soc. chim. France sous presse.
- (56) C. FOUQUEY, E. LEDERER, O. LÜDERITZ, J. POLONSKY, A.M. STAUB, S. STIRM, R. TINELLI et O. WESTPHAL - Synthèse de 3,6-didésoxy-hexoses ; détermination de la structure des sucres naturels : abéquose, colitose, tyvelose, ascarylose, C.R. Acad. Sciences, 1958, 246, 2417.
- (57) C. FOUQUEY, J. POLONSKY et E. LEDERER - Synthèse de trois 3,6-didésoxy-hexoses : détermination de la structure des sucres naturels : tyvelose, ascarylose et paratose. Bull. Soc. Chim. France. 1959, 803.
- (58) O. WESTPHAL et S. STIRM - Synthese der Abequose (3-Desoxy-D-Fucose), Liebigs Ann. 1959, 620, 8.
- (59) D.A. PRINS - Derivate der 3-Desoxy-D-glucose - Helv. Chim. Acta, 1946, 29, 1.
J.W. PRATT et N.K. RICHTMYER - Crystalline 3-deoxy- α -D-ribo-hexose. Preparation and properties of 1,6-anhydro-3-deoxy- β -D-arabino-hexopyranose, 1,6-anhydro-3-deoxy- β -D-ribo-hexopyranose and related compounds. J. Amer. Chem. Soc. 1957, 79, 2597.
- (60) H.R. BOLLIGER et D.A. PRINS - 3-dexoxy-D-mannose - Helv. Chim. Acta 1946, 29, 1061.
- (61) F. WEYGAND et H. WOLZ - 2-Desoxy-D-xylose aus D-glucose über 3-Desoxy-D-galaktose - Ber. 1952, 85, 259.
- (62) H. SCHMID et P. KARRER - Über die Umsetzungsprodukte von Toluolsulfonsäureestern mit Lithiumaluminiumhydrid - Helv. Chim. Acta, 1949, 32, 1371.
- (63) R. ALLERTON et W.G. OVEREND - Deoxy-sugars - Part. XIX - The

- conversion of D-arabinose into 3-deoxy-D-xylose derivatives - J. chem. Soc. 1951, p.1480.
- (64) G. CHARALAMBOUS et E. PERCIVAL - Products from the alkaline and reductive fission of the epoxide ring of methyl 3,4- and 2,3-anhydro-6-deoxy- α -L-taloside and of their methylated derivatives. J. Chem. Soc. 1954, p.2443.
- (65) E. VIS et P. KARRER - Neue Synthese des 3-desoxy-4,6-benzyliden- α -methyl-D-glucopyranosids - Helv. chim. Acta. 1954, 37, 378.
- (66) D.A. PRINS - Reduction of sugar epoxides to desoxysugars. J. Am. Chem. Soc. 1948, 70, 3955.
- (67) E.E. PERCIVAL et E.G.V. PERCIVAL - 3,4-Dimethyl-L-fucose and 2,3-dimethyl L-rhamnose - J. Chem. Soc. 1950, p.690.
- (68) W. KLYNE - Progress in stereochemistry - Londres - 1954, p.205.
- (69) K.SERCK-HANSEN, S. STÄLLBERG-STENHAGEN et E. STENHAGEN - Optically active higher aliphatic hydroxy compounds - I - The resolution of 3-acetoxy-butanoic acid and the synthesis of (+) - and (-) -2 eicosanol - Chem. Abstr. 1954, 5071, f. Ark. Kemi, 1953, 5, 203.
- (70) R.S. CAHN, C.K. INGOLD et V. PRELOG - The specification of asymmetric configuration in organic chemistry. Experientia, 1956, 12, 81.
- (71) W. KLYNE - The configuration of the anomeric carbon atoms in some cardiac glycosides - Biochem. J. 1950, 47, xli.
- (72) O. WESTPHAL - Récentes recherches sur la chimie et la biologie des endotoxines des bactéries à gram-négatif. Ann. Inst. Pasteur, 1960, 98, 789.
- (73) A.M. STAUB - Bases chimiques de la spécificité immunologique des antigènes des *Salmonella*. Ann. Inst. Pasteur. 1960, 98, 814.
- (74) O. WESTPHAL et O. LÜDERITZ - 3,6-didésy-oxy-hexosen Chemie und Biologie - Angew. Chem. 1960, 72, 881.
- (75) A. BOIVIN, I. MESROBEANU et L. MESROBEANU - Technique pour la préparation des polysaccharides microbiens spécifiques C.R. Soc. Biol. 1933, 113, 490. Extraction d'un complexe toxique et antigénique à partir du bacille d'Aertrycke - C.R. Soc. Biol. 1933, 114, 307.
- (76) W.T.J. MORGAN - Studies in immunochemistry - II - The isolation and properties of a specific antigenic substance from *B. dysenteriae* (Shiga) Biochem. J. 1937, 31, 2003.
W.T.J. MORGAN et S.M. PARTRIDGE - Studies in immunochemistry - 4 - The fractionation and nature of antigenic material isolated from *Bact. dysenteriae* (Shiga), Biochem. J. 1940, 34, 169. Studies in immunochemistry - 6 - The use of phenol and of alkali in the degradation of antigenic material isolated from *Bact. dysenteriae* (Shiga) - Biochem. J. 1941, 35, 1140.
- (77) W.F. GOEBEL, F. BINKLEY et E. PERLMAN - Studies on the Flexner group of dysentery bacilli - I - The specific antigens of *Shigella paradysenteriae* (Flexner). J. Exp. Med. 1945, 81, 315.
- (78) O. WESTPHAL et O. LÜDERITZ - Chemische Erforschung von lipopolysacchariden gram negativer Bakterien - Angew. Chem. 1954, 66, 407.
- (79) O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ et F. BISTER - Über die Extraktion von Bakterien mit Phenol/Wasser. Z. Naturforschg, 1952, 7b, 148.

- (80) O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, E. EICHENBERGER et W. KEIDERLING - Über bakterielle Reizstoffe (lipoid A) I. Mitt. Reindarstellung eines Polysaccharid - Pyrogens aus *Bakterium coli* Z. Naturforschg, 1952, 7b, 536.
- (81) A. BOIVIN et L. MESROBEANU - Recherches sur les antigènes somatiques et sur les endotoxines des bactéries - I. Considérations générales et exposé des techniques utilisées. Rev. Imm. 1935, 1, 553. II - L'antigène somatique complet (antigène O) de certaines bactéries est le constituant principal de leur endotoxine. Rev. Imm. 1936, 2, 113. III - Antigène somatique O "complet" et variations bactériennes - Rev. Imm. 1937, 3, 319.
- (82) F. BINKLEY, W.F. GOEBEL et E. PERLMAN - Studies on the Flexner group of dysentery bacilli - II - The chemical degradation of the specific antigen of type Z. *Shigella paradysenteriae* (Flexner) J. Exp. Med. 1945, 81, 331.
C. TAL et W.F. GOEBEL - On the nature of the toxic component of the somatic antigen of *Shigella paradysenteriae* type Z (Flexner). J. Exp. Med. 1950, 92, 25.
- (83) O. WESTPHAL, A. NOWOTNY, O. LÜDERITZ, H. HURNI, E. EICHENBERGER et G. SCHONHOLZER - Die Bedeutung der Lipid-Komponente (Lipoid A) für die biologischen Wirkungen bakterieller Endotoxine (Lipopolysaccharide) - Pharm. Acta. Helv. 1958, 33, 401.
- (84) G. SCHMIDT, E. EICHENBERGER et O. WESTPHAL - Die Wirkung der Lipid - und Polysaccharid - Komponente endotoxischer Lipopolysaccharide gram-negativer Bakterien auf die Leukozyten-Kultur, Experientia, 1958, 14, 289.
- (85) A.M. STAUB et R. TINELLI - Etude immunochemique sur les Salmonelles. IV - Structure chimique de certains motifs antigéniques présents dans les "antigènes" 0, 9 et 12 du tableau de White-Kauffmann. Bull. Soc. Chim. Biol. 1957, 39, suppl. I. p.65.
- (86) F. KAUFFMANN, O. LÜDERITZ, H. STIERLIN et O. WESTPHAL - Sur Immunchemie der O-Antigene von Enterobacteriaceae : I - Analyse der Zuckerbausteine von Salmonella O. Antigenen. Zbl. Bakt. I Orig. 1960, 178, 442.
- (87) O. LÜDERITZ, F. KAUFFMANN, H. STIERLIN, O. WESTPHAL - Zur Immunchemie der O. Antigene von Enterobacteriaceae. II - Vergleich der Zuckerbausteine von Salmonella S- R-, und T. Formen. Zbl. Bakt. I Orig. 1960, 179, 180.
O. WESTPHAL, F. KAUFFMANN, O. LÜDERITZ et H. STIERLIN - Zur Immunchemie der O. Antigene von Enterobacteriaceae. III - Analyse der Zuckerbausteine kreuzreagierender Salmonella - Arizona - und Escherichia-O-Antigene Zbl. Bakt. I. Orig. 1960, 179, 336.
- (88) A.M. STAUB, R. TINELLI, O. LÜDERITZ et O. WESTPHAL - Etude immunochemique sur les Salmonella. V. Rôles de quelques sucres, et en particulier des 3,6-didésoxy-hexoses, dans la spécificité des antigènes 0 du tableau de Kauffmann-White. Ann. Inst. Pasteur. 1959, 96, 303.
- (89) O. WESTPHAL, O. LÜDERITZ, A.M. STAUB et R. TINELLI - Vorkommen und immunologische Differenzierung zweier optischer Antipoden - Abequose und Colitose (3-Désoxy-D- et -L-fucose) - als determinante Endgruppen in Salmonella-O-Antigen - Zbl. Bakt. I Orig. 1959, 174, 307.

- (90) O. LÜDERITZ, O. WESTPHAL, A.M. STAUB et L. LE MINOR - Preparation and immunological properties of an artificial antigen with colitose (3-désoxy-L-fucose) as the determinant group. *Nature*, 1960, 188, 556.
- (91) M. A. CYNKIN et G. ASHWELL - Studies on the biosynthesis of colitose - *Bact. Proc.* 1960, 161, p.45.
- (92) H. HOLLDORF, W. BERNHARDT et H. GRUNECKE - Congrès de Biochimie, Zurich, 10-12 Octobre 1960.
- (93) E. C. HEATH - The metabolism of colitose - *Feder. Proc.* 1960, 19, 85.
- (94) E. KUHN, H. H. BAER et A. GAUE - 2 - α - L - fucopyranosyl - D - galaktose und 2 - α - L - Fucopyranosyl-D-talose. Zur Einwirkung von Alkali auf Oligosaccharide- *Liebigs Ann.* 1958, 611, 242.
- (95) P. A. LEVENE et I. E. MUSKAT - The structure and the properties of acetone-methylrhamnopyranoside. *J. Biol. Chem.* 1934, 105, 431.

TABLE DES MATIÈRES

	Pages
INTRODUCTION	5
LES LIPIDES D'ASCARIS	7
A - Les acides gras	7
B - L'insaponifiable	8
a) L'alcool ascarylique	8
b) Les stérols	9
C - Substances non identifiées	9
TRAVAUX ANTERIEURS SUR LA STRUCTURE CHIMIQUE DE L'"ALCOOL ASCARYLIQUE"	10
TECHNIQUES UTILISEES	12
I - CHROMATOGRAPHIE	12
A - Chromatographie par adsorption	12
B - Chromatographie de partage	12
a) Chromatographie sur colonne	12
b) Chromatographie sur papier ascendante ou descendante	14
c) Chromatographie sur papier circulaire	14
II - TECHNIQUES ANALYTIQUES	15
III - TECHNIQUES DIVERSES	16
RESULTATS DE NOS PROPRES TRAVAUX	17
PARTIE THEORIQUE	17
<u>Chapitre I</u> - ISOLEMENT ET DESCRIPTION DES ASCAROSIDES ...	17
I - Isolement de l'"alcool ascarylique"	17
II - Séparation de l'"alcool ascarylique" en ascaroside A, B, et C	17
III - Propriétés communes aux trois ascarosides	18
<u>Chapitre II</u> - ASCAROSIDE A	21
I - Propriétés de l'ascaroside A	21
II - Propriétés et dérivés de l'aglycone A	21
III - Formule partielle de l'ascaroside A	23
<u>Chapitre III</u> - ASCAROSIDE B	24
I - Propriétés et dérivés de l'ascaroside B	24
II - Propriétés et dérivés de l'aglycone B	25

	Pages
III - Dégradation de l'aglycone B	26
IV - Formule développée de l'aglycone B	28
V - Formule partielle de l'ascaroside B	29
<u>Chapitre IV</u> - ASCAROSIDE C	31
I - Propriétés et dérivés de l'ascaroside C	31
II - Aglycone C	31
III - Formule partielle de l'ascaroside C	32
<u>Chapitre V</u> - ASCARYLOSE	33
I - Preuves de la présence d'un sucre dans l'hydrolysate d'ascaroside	33
II - Isolement et description de l'ascarylose	34
III - Etablissement de la formule brute de l'ascarylose	35
IV - Etablissement de la formule développée de l'ascarylose ..	36
a) nature du groupement réducteur	36
b) oxydation périodique	36
c) Ascarylitol	37
d) Formule développée de l'ascarylose	37
<u>Chapitre VI</u> - AUTRES 3,6-DIDESOXY-HEXOSES NATURELS	41
<u>Chapitre VII</u> - SYNTHÈSE DE TROIS 3,6-DIDESOXY-HEXOSES	43
I - Synthèse du 3,6-Didésoxy D- <i>arabino</i> -hexose	45
Structure du tyvelose	45
Structure de l'ascarylose	46
II - Synthèse du 3,6-didésoxy D- <i>ribo</i> -hexose	47
Structure du paratose	47
III - Synthèse du 3,6-didésoxy L- <i>lyxo</i> -hexose	48
Propriétés du 3,6-didésoxy L- <i>lyxo</i> -hexose et de l'hexitol correspondant	50
<u>Chapitre VIII</u> - FORMULES DÉVELOPPÉES DES TROIS ASCAROSIDES	52
I - Mode de liaison entre les aglycones et l'ascarylose dans les ascarosides	52
II - Configuration des aglycones	52
III - Configuration de la liaison glycosidique dans les trois ascarosides	53
IV - Formules développées des trois ascarosides	54
<u>ROLE BIOLOGIQUE DES 3,6-DIDESOXY-HEXOSES</u>	55
A - Activité biologique des endotoxines de bactéries gram-négatives	55
B - Composition des endotoxines	55
C - Activité immunologique des endotoxines - Rôle du polysaccharide	56
D - Emplacement et rôle des didésoxysucres dans les polysaccharides	58
E - Synthèse d'un antigène artificiel	59
F - Biosynthèse des didésoxy-hexoses	60
G - Conclusion	60

	Pages
PARTIE EXPERIMENTALE	61
<u>Chapitre I</u> - ISOLEMENT & DESCRIPTION DES ASCAROSIDES ...	61
I - Isolement de l'"alcool ascarylique"	61
II - Séparation de l'"alcool ascarylique" en ascarosides A, B, et C	61
III - Propriétés communes aux trois ascarosides	63
<u>Chapitre II</u> - ASCAROSIDE A	65
I - Propriétés et dérivés de l'ascaroside A	65
II - Propriétés et dérivés de l'aglycone A	65
<u>Chapitre III</u> - ASCAROSIDE B	68
I - Propriétés et dérivés de l'ascaroside B	68
II - Propriétés et dérivés de l'aglycone B	70
III - Dégradation de l'aglycone B	74
IV - Formule développée de l'aglycone B	75
V - Formule partielle de l'ascaroside B	77
<u>Chapitre IV</u> - ASCAROSIDE C	79
I - Propriétés et dérivés de l'ascaroside C	79
II - Aglycone C	80
III - Formule partielle de l'ascaroside C	80
<u>Chapitre V</u> - ASCARYLOSE	81
I - Preuves de la présence d'un sucre dans l'hydrolysat d'as- caroside	81
II - Isolement et description de l'ascarylose	81
III - Etablissement de la formule brute de l'ascarylose	83
IV - Etablissement de la formule développée de l'ascarylose .	83
a) Nature du groupement réducteur de l'ascarylose	83
b) Oxydation périodique	84
c) Ascarylitol	85
d) Formule développée de l'ascarylose	85
<u>Chapitre VII</u> - SYNTHÈSE DE TROIS 3,6-DIDESOXY-HEXOSES	88
I - Synthèse du 3,6-didésoxy D- <i>arabino</i> -hexose	88
II - Synthèse du 3,6-didésoxy D- <i>ribo</i> -hexose	89
III - Synthèse du 3,6-didésoxy L- <i>lyxo</i> -hexose	90
<u>Chapitre VIII</u> - FORMULE DEVELOPPEES DES TROIS ASCARO- SIDES	92
Mode de liaison entre les aglycones et l'ascarylose dans les ascarosides	92
RESUME	93
BIBLIOGRAPHIE	97

DEUXIEME THESE

Propositions données par la Faculté

CHIMIE DE LA STREPTOMYCINE

Vu et approuvé :

Paris, le 13 Mai 1961

Le Doyen de la Faculté des Sciences,
J. PERES

Vu

et Permis d'imprimer :

Le Recteur de l'Académie
de Paris,
Jean SARRAILH

IMP. LOUIS-JEAN — GAP

Dépôt légal n° 115 — 1961

